



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

**Efecto del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo)
sobre el daño cerebral inducido por cloruro de
mercurio y función cognitiva en ratones**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición

AUTOR

Olenka Isabel PUELLES SAMANIEGO

ASESOR

Dr. Oscar Gustavo HUAMÁN GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Puelles O. Efecto del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) sobre el daño cerebral inducido por cloruro de mercurio y función cognitiva en ratones [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Nutrición; 2020.

Información complementaria

Código ORCID del asesor (es)	0000-0002-6224-9165
Autor	Olenka Isabel Puelles Samaniego
DNI o Pasaporte /carnet de extranjería (sólo extranjeros)	77476759
Asesor	Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez
DNI	10454580
Código ORCID del autor	---
Grupo de investigación	SALUTARIS CIBUS ET PLANTAE
Financiamiento	Si. Código de proyecto: A19010344
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación (incluirse localidades y/o coordenadas geográficas).	Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición – Facultad de Medicina - UNMSM
Año o rango de años que la investigación abarcó.	3 años



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

«Año de la universalización de la salud»

**ACTA N° 08-2020 SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN NUTRICIÓN¹
Autorizado por RD-0608-2020-D-FM**

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN : 06 DE JULIO 2020

HORA INICIO : 3:00 PM

HORA TÉRMINO : 4:05 PM

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE : Dra. Silvia Suárez Cunza - Docente Principal

MIEMBRO : Dr. Henry Guija Guerra - Docente Auxiliar

MIEMBRO : Mag. Gabriella Veeruska Ugarelli Galarza - Docente Contratado

ASESOR : Dr. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez - Docente Asociado

3. DATOS DEL TESISISTA

APELLIDOS Y NOMBRES : Puelles Samaniego Olenka Isabel

CÓDIGO : 15010212

R.R. DE GRADO DE BACHILLER : N°012490-2020-R/UNMSM

TÍTULO DE LA TESIS*: Efecto del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) sobre el daño cerebral inducido por cloruro de mercurio y función cognitiva en ratones
*(Aprobado RD-N°0314-D-FM-2019)

¹ Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

https: <https://medical-int.zoom.us/j/99497408147>

ID: 994 9740 8147

Grabación archivada en Grabaciones de Sustentación

DRIVE: SECRETARIA/4-SUSTENTACIÓN/8-Olenka Isabel Puelles Samaniego



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

«Año de la universalización de la salud»

4. RECOMENDACIONES:

5. NOTA OBTENIDA

18

(Dieciocho)

6. PÚBLICO ASISTENTE

No	Nombre y Apellidos	DNI
1	Brighet Yoselin Hilario Bendezu	74284372
2	Eric J. Estrada Samaniego	75784268
3	Rita Samaniego Agurto	32131259
4	Ángela Santa María	77477988
5	Jossue Paredes Contreras	70569362
6	Sandra Aracelli Poicón Flores	76481152
7	Raisa Nataly Romani Carrión	48077300
8	Oscar Marcelo Pittman	70350563
9	Francisco Marquina Sanchez	72403196
10	Elena Amalia Mayta Arrunátegui	73822514
11	Yelena Yaneth Hilario Chuquillanqui	70904861



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

«Año de la universalización de la salud»

7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

Estando de acuerdo con la presente acta, el Jurado de Sustentación firma en señal de conformidad:

Dra. Silvia Suárez Cunza

Docente Principal

Presidente

Dr. Henry Guija Guerra

Docente Auxiliar

Miembro

Mag. Gabriella Veerуска Ugarelli Galarza

Docente Contratada

Miembro

Dr. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Docente Asociado

Asesor



DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a mi madre Isabel Noemi Samaniego Agurto, quien es la fortaleza y motivación para mi crecimiento tanto en lo profesional como en lo humanístico.

A mis abuelos Noemi Agurto y Manuel Puelles, por ser mi inspiración para seguir alcanzando mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme en cada paso y poner ángeles en mi camino.

Al Dr. Oscar Huamán por su apoyo, amistad y enseñanzas durante todo el proceso de elaboración de tesis, sobre todo por su dedicación como docente y su compromiso con cada uno de sus asesorados.

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón” de la Facultad de Medicina de la UNMSM por brindarnos el ambiente idóneo para la ejecución de la tesis.

A Oscar Santa María e Isabel Samaniego, quienes me brindaron su apoyo incondicional para poder llevar a cabo la culminación de mi tesis.

A mis tías Rita, Minerva y Gina Samaniego, por ser cómplices desde el primer día de mi vida, a pesar de la distancia su apoyo fue vital para seguir con mis sueños.

A mis tíos Eric Estrada, Alex Lubi, Vladimir e Ilich Samaniego, por ser excelentes seres humanos y brindarme su cariño y apoyo en todo momento.

A mis amigos de laboratorio, por su apoyo en el procesamiento de tesis, en especial a Jossue Paredes por su apoyo en la redacción de la misma.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado por el financiamiento del presente trabajo.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	9
2.1.	Hipótesis.....	9
2.2.	Objetivos.....	9
III.	METODOLOGÍA.....	10
3.1.	Tipo de Investigación.....	10
3.2.	Muestra.....	10
3.3.	Variables.....	10
3.4.	Materiales.....	12
3.5.	Equipos e Instrumentos.....	12
3.6.	Recolección del fruto y obtención del zumo.....	13
3.7.	Acondicionamiento de la unidad de análisis.....	13
3.8.	Método de evaluación de la neuroprotección.....	14
3.9.	Preparación del homogenizado.....	15
3.10.	Procesamiento de los indicadores.....	15
3.11.	Análisis de datos estadísticos.....	19
3.12.	Consideraciones éticas.....	19
IV.	RESULTADOS.....	20
4.1.	Niveles de lipoperoxidación en el tejido cerebral.....	20
4.2.	Perfil de GSH en tejido cerebral.....	21
4.3.	Actividad de superóxido dismutasa y catalasa	21
4.4.	Índice de cerebro y cerebelo.....	22
4.5.	Descripción histológica del tejido neuronal.....	23
4.6.	Evaluación cognitiva.....	27
V.	DISCUSIÓN.....	28
VI.	CONCLUSIONES	37
VII.	RECOMENDACIONES.....	38
VIII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	39
	ANEXOS.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. Niveles de lipoperoxidación en homogenizado de tejido cerebral según grupos.....	20
Tabla 02. Niveles de perfil de GSH en tejido cerebral según grupos.....	21
Tabla 03. Actividad de superóxido dismutasa, catalasa y su relación en tejido cerebral según grupos.....	22
Tabla 04. Porcentaje de índice de cerebro y cerebelo según grupos.....	22
Tabla 05. Indicadores de aprendizaje y memoria según grupos	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Análisis histológico

Figura 1. Grupo I: muestra de cerebro (Suero fisiológico)	25
Figura 2. Grupo I: muestra de cerebelo (Suero fisiológico)	25
Figura 3. Grupo II: muestra de cerebro (Suero fisiológico + HgCl ₂ por 7 días)	25
Figura 4. Grupo II: muestra de cerebelo (Suero fisiológico + HgCl ₂ por 7 días)	25
Figura 5. Grupo III: muestra de cerebro (Vitamina E 40 UI + HgCl ₂ por 7 días)	26
Figura 6. Grupo III: muestra de cerebelo (Vitamina E 40 UI + HgCl ₂ por 7 días)	26
Figura 7. Grupo IV: muestra de cerebro (zumo 0,5 mL/kg + HgCl ₂ por 7 días)	26
Figura 8. Grupo IV: muestra de cerebelo (zumo 0,5 mL/kg + HgCl ₂ por 7 días)	26
Figura 9. Grupo V: muestra de cerebro (zumo 2 mL/kg + HgCl ₂ por 7 días)	26
Figura 10. Grupo V: muestra de cerebelo (zumo 2 mL/kg + HgCl ₂ por 7 días)	26
Figura 11. Grupo VI: muestra de cerebro (zumo 8 mL/kg + HgCl ₂ por 7 días)	27
Figura 12. Grupo VI: muestra de cerebelo (zumo 8 mL/kg + HgCl ₂ por 7 días)	27

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I: fruto de <i>Solanum quitoense</i> (lulo).....	51
ANEXO II: Clasificación taxonómica del fruto (<i>Solanum quitoense</i>).....	52
ANEXO III: Certificado Sanitario de la unidad de análisis.....	53
ANEXO IV: Administración del zumo del fruto <i>Solanum quitoense</i> (lulo)....	54
ANEXO V: Flujograma de la ejecución experimental.....	55
ANEXO VI: Disección de hemisferios cerebrales y cerebelo.....	56
ANEXO VII: Realización de prueba cognitiva aplicando el Laberinto en T...	57

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades neurodegenerativas han ido en aumento durante las últimas décadas, siendo la demencia la principal patología con mayor repercusión a nivel global; sin embargo, los mecanismos biológicos y/o ambientales son todavía una incógnita; por ello, el objetivo en la actualidad es prevenir o ralentizar su aparición y dar una mejor calidad de vida a los pacientes ya diagnosticados. **Objetivo:** Evaluar el efecto neuroprotector del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) frente al daño inducido por cloruro de mercurio (II) en ratones. **Materiales y métodos:** Experimental puro con grupo control y postprueba; se emplearon 42 ratones albinos *Mus musculus* cepa BALB/c, machos y el zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo). El fruto de lulo fue adquirido en la provincia de Oxapampa. El zumo fue obtenido mediante un extractor. Los ratones fueron distribuidos al azar en seis grupos (n=7), todos los tratamientos fueron administrados vía peroral, durante siete días: El grupo I y II recibieron NaCl 0,9% a 10 mL/kg; el grupo III recibió vitamina E a dosis de 40 UI/kg y, los grupos IV, V y VI, recibieron el zumo a dosis de 0,5; 2 y 8 mL/kg respectivamente. Una hora después del tratamiento recibieron HgCl₂ a dosis de 10 mg/kg, excepto al grupo I, a quien se le volvió a administrar NaCl 0,9% a la misma dosis. Durante los siete días de tratamiento se aplicó la prueba para evaluar aprendizaje y memoria según Deacon R. y Rawlis N. Terminado el tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación, luego se extrajo el cerebro y cerebelo para el análisis bioquímico e histológico. Se aplicó la prueba Shapiro Wilk para evaluar Normalidad. Se empleó la prueba ANOVA a los indicadores con distribución paramétrica (índice de cerebro y cerebelo, GSH Y GHS TOTAL y niveles de catalasa) y la prueba Kruskal Wallis para los indicadores con distribución no paramétrica (niveles de lipoperoxidación, relación GSH/GSSG, niveles de SOD, relación SOD/CAT e indicadores de la evaluación cognitiva). **Resultados:** La administración del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) disminuyó significativamente ($p<0,05$) ($p<0,01$) los niveles de índice de cerebro en los grupos V y VI respectivamente, comparado con el G II; los niveles de TBARs disminuyeron significativamente ($p<0,01$) en los G IV, V y VI en comparación con el G II; los niveles de la relación de GSH/GSSG tuvieron un aumento en los G V y VI, llegando a ser significativo ($p<0,01$); los niveles de catalasa aumentaron significativamente ($p<0,05$) para los G IV, V y VI comparado al G II; los niveles de la relación SOD/CAT disminuyeron significativamente ($p<0,05$) para los G IV, V y VI en comparación al G II; por último, el tiempo de latencia y número de intentos fueron significativamente ($p<0,01$) menores para los G IV, V y VI en comparación con el G II. **Conclusiones:** La ingesta del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) presentó efecto neuroprotector frente a la toxicidad inducida por cloruro de mercurio (II) en ratones.

Palabras clave: enfermedades neurodegenerativas, cloruro de mercurio, función cognitiva, efecto neuroprotector.

ABSTRACT

Introduction: Neurodegenerative diseases have been on the rise over the last few decades, with dementia being the main pathology with the greatest global impact; however, biological and/or environmental mechanisms are still unknown; therefore, the goal today is to prevent or slow its appearance and give a better quality of life to patients already diagnosed. **Objective:** To assess the neuroprotective effect of fruit juice *Solanum quitoense* (lulo) against damage induced by mercury (II) chloride in mice. **Materials and methods:** Pure experimental with control group and post-test; 42 albino mice *Mus musculus* strain BALB/c, male and juice of the fruit *Solanum quitoense* (lulo) were used. The lulo fruits were acquired from the province of Oxapampa. The juice was obtained by means of an extractor. The mice were randomly distributed in six groups (n=7), all treatments were administered orally, for seven days: Group I and II received NaCl 0,9% 10 mL/kg; Group III received vitamin E at doses of 40 IU/kg and, groups IV, V and VI, received the juice at doses of 0.5; 2 and 8 mL/kg respectively. One hour after treatment they received HgCl₂ at a dose of 10 mg/kg, except for group I, who was given NaCl 0,9% again at the same dose. During the seven days of treatment, the test was applied to assess learning and memory according to Deacon R. and Rawlis N. After the treatment, the animals were sacrificed by decapitation, then the brain and cerebellum were removed for biochemical and histological analysis. The Shapiro Wilk test was applied to evaluate Normality. The ANOVA test was used to indicators with parametric distribution (brain and cerebellum index, GSH and GSH TOTAL and catalase levels) and the Kruskal Wallis test for indicators with nonparametric distribution (lipoperoxidation levels, GSH/GSSG ratio, SOD levels, SOD/CAT ratio and cognitive assessment indicators). **Results:** Administration of the juice of the fruit *Solanum quitoense* (lulo) significantly decreased ($p<0,05$) ($p<0,01$) brain index levels in groups V and VI respectively, compared to G II; TBAR levels decreased significantly ($p<0,01$) in G IV, V and VI compared to G II; GSH/GSSG ratio levels increased in G Vs and VI, becoming significant ($p<0,01$); catalase levels increased significantly ($p<0,05$) for G IV, V and VI compared to G II; SOD/CAT ratio levels decreased significantly ($p<0,05$) for G IV, V and VI compared to G II; Finally, the latency time and number of attempts were significantly ($p<0,01$) lower for G IV, V and VI compared to G II. **Conclusions:** The ingestion of the juice of the fruit *Solanum quitoense* (lulo) presented a neuroprotective effect against toxicity induced by mercury (II) chloride in mice.

Keywords: neurodegenerative diseases, mercury chloride, cognitive function, neuroprotective effect.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas han ido en aumento durante las últimas décadas debido al incremento de la expectativa de vida en la población mundial¹, convirtiendo a la enfermedad de Alzheimer (EA) en una de las causas principales de morbilidad en el paciente anciano².

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la EA como una enfermedad neurodegenerativa de etiología desconocida, la cual se caracteriza por un deterioro progresivo de la memoria y la función cognitiva³. Asimismo, se han descrito factores de riesgo como la edad avanzada, sexo femenino, consumo de alcohol, el tabaquismo, la hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, la obesidad, la sobreexpresión del alelo APOE ε4, la reserva cognitiva baja y un nivel bajo de educación^{4, 5}.

En el periodo de 1990 y 2013, las estadísticas mundiales del Global Burden Disease Study, reportaron que la EA se encontraba dentro de las 50 causas principales de pérdida de la vida⁶.

En la actualidad 50 millones de personas padecen de demencia en todo el mundo, de las cuales dos tercios tienen como factor causal a la EA, considerándose que esta cifra podría incrementarse a 152 millones para el año 2050^{3,7}.

En Europa se encontró una prevalencia de EA en 5,05%, siendo más frecuente en mujeres e incrementándose con la edad⁴. En Estados Unidos se estima que 5,8 millones de personas padecen de EA, de los cuales 5,6 millones tienen 65 años⁸. En Brasil, se realizó un estudio el cuál sostuvo que de 855 pacientes con EA el 69,6% eran de sexo femenino⁹.

En el Perú, el Ministerio de Salud (setiembre del 2019), reportó que más de 200 mil habitantes mayores de 60 años padecen de EA¹⁰. En el año 2014 se atendieron a 1,2 millones de personas adultos mayores, de los cuales 5 mil fueron diagnosticadas con EA, y a finales del año 2015 se registraron 3700 casos nuevos¹¹.

En el año 2013 se creó el plan nacional para la Enfermedad de Alzheimer y otras demencias, el cual promueve un sistema de atención integral de salud que permite afrontar la atención a las personas que sufran de estas enfermedades,

sobre todo para prevenir, mejorar la evaluación y el diagnóstico, brindando tratamiento y rehabilitación a los pacientes que sufren estas enfermedades¹².

El encéfalo está conformado por cerebro, cerebelo, tronco encefálico y diencefalo. El cerebro está constituido por la corteza y el cuerpo calloso. El cerebelo está conformado por los hemisferios cerebelosos y el vermis. El tronco encefálico consta de tres partes: el bulbo raquídeo, la protuberancia anular y el mesencefalo. Por último, el diencefalo está formado por el tálamo y el hipotálamo¹³.

En la estructura del cerebro se encuentra la corteza que es la parte externa de los hemisferios, la cual tiene pocos milímetros de espesor y está compuesta por la sustancia gris, esta sustancia está formada en su mayoría por cuerpos neuronales. En el interior de los hemisferios se encuentra la sustancia blanca cuya composición es principalmente las fibras nerviosas de dichas neuronas¹⁴.

La corteza cerebral, se divide en área motora, sensitiva y de asociación. En el área motora primaria se desencadena la contracción de determinadas fibras musculares esqueléticas, en el área pre-motora se generan los impulsos nerviosos y se almacenan patrones aprendidos de comportamiento motor. El área sensorial localiza con exactitud los puntos donde se originan las sensaciones. En el área de asociación se generan los procesos psíquicos superiores, las capacidades, la conciencia y la personalidad¹⁵.

La corteza del cerebelo está formada por sustancia gris, en el interior se encuentra principalmente la sustancia blanca con núcleos de sustancia gris, posee también unas cavidades llamadas ventrículos, las cuales contienen líquido cefalorraquídeo¹⁴.

El diencefalo comprende al tálamo y al hipotálamo; el tálamo funciona como un centro de interpretación para algunos impulsos sensitivos, también se encarga de ciertas emociones y de la memoria¹⁵.

Las neuronas cumplen funciones como la recepción y transmisión de impulsos nerviosos al SNC, las células neurogliales tienen la función de apoyo metabólico, mecánico y la protección de neuronas. Los astrocitos proveen apoyo en la estructura y metabolismo a las neuronas, actúan también eliminando iones y neurotransmisores al espacio extracelular. Los oligodendrocitos intervienen en la producción de mielina y el aislamiento eléctrico. Las células de microglía son

miembros del sistema fagocítico mononuclear, estas células funcionan como fagocitos para eliminar desechos y estructuras dañadas del SNC¹⁶.

Una de las principales funciones del SN radica en procesar la información que llega de tal manera que dé lugar a las respuestas motoras y mentales adecuadas, a este proceso se le conoce como sinapsis. La reserva de la información es el proceso llamado memoria, una vez que esta información está almacenada en el SN, estos servirán para seleccionar información que resulte importante con el fin de permitir su uso en el futuro, las cuales darán respuestas corporales inmediatas¹⁵.

La memoria puede ser dividida en memoria de corto y largo plazo. La memoria de corto plazo se caracteriza por tener una capacidad limitada; en cambio, la de largo plazo puede almacenar grandes cantidades de información y su duración es ilimitada, esta se subclasifica en memoria declarativa y no declarativa, en esta última los recuerdos son obtenidos por condicionamiento clásico, como también por aprendizaje mediante hábitos o habilidades^{17, 18}.

La formación de nueva memoria se da de forma frecuente, donde participan varios pasos como, la adquisición, el almacenamiento y la capacidad de traer nuevamente al presente la información almacenada, estando los recuerdos continuamente consolidados en el neocórtex^{17, 19, 20}.

Por otro lado, la formación de la memoria a largo plazo está a cargo del hipocampo, el cual desempeña un papel clave, siendo una estructura crítica para la memoria espacial en roedores, primates y seres humanos, esta memoria espacial es la responsable de la información acerca de la ubicación de los objetos, recorridos específicos, disposiciones y localizaciones espaciales; lo que permite al individuo desarrollarse en un entorno^{18, 21}.

Diversos estudios han identificado que existen neuronas hipocámpales que codifican lugares específicos de un medio (células de lugar), las cuales dependen de la ubicación del animal en el medio ambiente para activarse y son independientes de cualquier estímulo específico o comportamiento en curso²².

Con el pasar de los años se presentan cambios propios del envejecimiento, estos pueden ser de tipo morfológicos, bioquímicos, metabólicos y circulatorios, los cuales van a depender de la plasticidad cerebral y de la actividad constante de muchas funciones cerebrales, dichos cambios pueden conllevar a presentar alteraciones cognitivas o continuar su función normal²³.

La EA es característica por presentar placas neuríticas extracelulares tanto en la corteza como en las paredes de los vasos sanguíneos menígeos y cerebrales. Dichas placas poseen un centro de material amiloide el cual está rodeado de neuritas distróficas, astrocitos reactivos y microglia. Otras complicaciones son la formación de madejas neurofibrilares intraneuronales, pérdida de neuronas y de sinapsis, astrocitosis reactiva y proliferación de la microglia²⁴.

Las placas beta-amieloides se constituyen por un núcleo o core, el principal componente de esta es la beta amiloide, otras sustancias que están involucradas en la formación de las placas son la alfa sinucleína, alfa 1 antitripsina, alfa 2-macroglobulina, la apolipoproteína E, ubiquitina y las presenilinas. Estas placas seniles se encuentran en mayor concentración en personas con déficit cognitivo y son más visibles en el neocórtex asociado a la pérdida sináptica. Dichas placas se van a clasificar por su estado evolutivo como difusas, primitivas, clásicas y quemadas²⁵.

Por otro lado, la degeneración neurofibrilar es consecuencia de la agregación intraneuronal de filamentos de proteínas tau patológicas, en primer lugar, estas agregaciones forman una cesta alrededor del núcleo sucesivamente llenan el citoplasma, primordialmente en el soma y la dendrita apical conllevando a neurodegeneración y muerte por apoptosis. Los ovillos neurofibrilares tienen su máxima concentración en el córtex límbico, esto se asocia con la despoblación neuronal, el patrón de atrofia y el déficit cognitivo^{25, 26}.

Otra de las causas más importantes de la EA es el estrés oxidativo, el cual es un desbalance entre los niveles de radicales libres (RL) y los antioxidantes en el organismo. Las sustancias como H₂O₂ o trióxido de nitrógeno forman grupos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) respectivamente, las cuales conducen a la neurodegeneración²⁷.

Los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular son muy susceptibles al ataque de los radicales libres²⁸, en la oxidación de estos lípidos se forman productos como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4HNE); la neurona a través de su conjugación con el glutatión (GSH) elimina al 4HNE, dicha reacción es catalizada por la enzima glutatión-S-transferasa, seguida por la acción de la proteína 1, la cual remueve el complejo GSH-4HNE de la célula²⁹.

Frente a estos ataques el organismo desarrolla un sistema de defensa, este puede estar conformado por elementos enzimáticos como no enzimáticos, los cuales actúan conjuntamente para proteger a la célula. La primera línea de defensa la conforma el componente de tipo enzimático dentro de los cuales se encuentra la superóxido dismutasa y catalasa, y los antioxidantes de tipo no enzimático como la vitamina C, el glutatión y polifenoles (flavonoides)³⁰.

La superóxido dismutasa tiene como función catalizar la dismutación del O_2^\bullet a H_2O_2 , el cual puede ser degradado por la catalasa y el glutatión peroxidasa. La catalasa es una hemoproteína que se concentra en las mitocondrias y en los peroxisomas, esta se encarga de catalizar el H_2O_2 a agua y oxígeno³⁰.

La vitamina C se halla tanto a nivel intra como extracelular en forma de ascorbato, actuando directamente frente al OH^\bullet , superóxido y algunos hidroperóxidos lipídicos. El glutatión es un compuesto tiólico de gran abundancia en mamíferos, actúa también sobre el radical hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno. Los polifenoles (flavonoides) son un grupo amplio que comprende a las catequinas, cianidinas, quercetinas, los cuales actúan como quelantes de metales neutralizando a los ROS³⁰.

El mercurio es un metal pesado que se halla en el ambiente en sus tres formas: mercurio elemental (Hg), mercurio inorgánico ($HgCl_2$) y mercurio orgánico ($MeHg$)³¹. A pesar de tener una baja liposolubilidad, se puede detectar su forma inorgánica en el cerebro, alterando así la homeostasis neuronal³². El mecanismo exacto y sus posteriores efectos a la exposición crónica, son poco conocidos. Una posible vía sería que, al momento de la captación de mercurio inorgánico, por el SNC, disminuye la actividad de Na^+/K^+ ATPasa en los microvasos corticales cerebrales³³, esto conllevaría al incremento de Na^{1+} intracelular despolarizando la neurona y abriendo los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que genera influjo de Ca^{2+} y aumento aún más del sodio intracelular, desencadenando en edema³⁴.

La exposición del individuo al mercurio ha sido asociada con efectos tan diversos como Demencia, Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, otros cuadros neurológicos, etc³⁵. El síndrome neurológico, en una primera fase se evidencia por la irritabilidad, debilidad muscular, pérdida de memoria, los cuales son producidos por daño en los centros corticales del sistema nervioso central, que puede conllevar a encefalitis, y a nivel histológico se observa degeneración axonal y alteraciones en los paquetes sensitivos y motores³⁶.

La alimentación, las actividades que incitan la cognición y la actividad física, desempeñan un papel importante para disminuir el riesgo de padecer EA. Por tal motivo, una dieta abundante en antioxidantes, complejo B, polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados y monoinsaturados es beneficiosa contra la EA. Estos nutrientes se pueden obtener a través de diversos alimentos como el pescado, frutas, vegetales, café y vino tinto. Por otro lado, se ha evidenciado que el exceso de grasas saturadas y el exceso de bebidas alcohólicas aumentan el riesgo de padecer EA³⁷.

Un alimento se puede considerar funcional si se demuestra su efecto a una o más funciones corporales específicas, adicionales a sus efectos nutritivos intrínsecos, de manera que ayude a mejorar el estado de salud y el bienestar de la persona, contrarrestando el riesgo de sufrir alguna enfermedad³⁸, por ello es importante conocer la composición nutricional de los diferentes alimentos que existen y están a nuestro alcance.

El lulo o naranjilla (*Solanum quitoense*) es una fruta climatérica³⁹, originaria de la región interandina, particularmente de Perú, Colombia y Ecuador^{40, 41, 42,43,44}, es cultivado a altitudes entre los 1600 y 2450 m s.n.m.⁴⁵ y crecen de forma espontánea en sitios frescos, sombreados, de preferencia cercanos a corrientes de agua; con temperaturas de entre 17 y 20° C. Existen dos variedades botánicas: *Solanum quitoense* var. *septentrionale*, la cual presenta espinas y *Solanum quitoense* var. *quitoense*, sin espinas⁴⁶.

Dentro de sus características el lulo es una fruta redonda-ovalada, con cáscara de color naranja brillante; internamente, se encuentra dividida en cuatro compartimentos, separados por segmentos membranosos, la pulpa es de color verde amarillento y posee numerosas semillas, se le atribuye un sabor ácido entre suave y fuerte^{39,41,47}.

Además de sus características organolépticas, el lulo es una fuente importante de vitaminas C, B1, B2 y algunos carotenoides precursores de la vitamina A^{41,42,45}, dentro de los cuales se encuentran el β -caroteno, la luteína y zeaxantina, a estos compuestos se le atribuyen beneficios para la salud, como el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares, oftalmológicas y diversas formas de cáncer⁴³. Además, presenta minerales como calcio, fósforo y hierro⁴⁴.

El lulo es también conocido por su alto contenido de compuestos fenólicos⁴², que se caracterizan por su actividad antimutagénica, anticarcinógena, antimicrobiana y antioxidante, dentro de los compuestos fenólicos de mayor proporción se encuentran el ácido clorogénico y ácido gálico, los cuales aumentan conforme incrementa la madurez del fruto⁴⁷; también posee flavonoides, siendo predominante el ácido dicafeonilquinona⁴¹.

En el estudio de Flechas 2008 se dio a conocer que las sapogeninas esteroidales extraídas de especies del género *Solanum* tenían importancia farmacéutica ya que se utilizaban como materia prima para la producción de medicamentos esteroidales. Los usos predominantes de dichos productos son el control del colesterol, la síntesis de hormonas, drogas para el tratamiento contra el cáncer y el Alzheimer e investigación de vacunas humanas (Herpes y VIH). Asimismo, se realizó un tamizaje fitoquímico donde fueron encontrados a parte de los carotenoides y esteroides, ácidos grasos, cumarinas, taninos, saponinas, triterpenos y polisacáridos⁴⁸.

En el año 2015 se realizó un estudio con *Solanum tuberosum* (papa nativa) el cual evaluó el efecto del extracto acuoso sobre las enzimas de detoxificación de fase II. Se determinaron los niveles de malondialdehído (MDA) y las actividades de glutatión S-transferasa (GST), entre otras. En el estudio fitoquímico se identificaron saponinas, polifenoles y flavonoides. Los resultados muestran que la formación de TBARS fue mayor en el grupo que recibió el tóxico (grupo II) y el grupo III que recibió el extracto de papa tuvo un efecto antilipoperoxidante de manera significativa comparado con el grupo II. Los polifenoles y saponinas son los más abundantes en el extracto y serían responsables del efecto antioxidante⁴⁹.

Del Giudice y cols. estudiaron el efecto protector de *Solanum lycopersicum* (tomate) frente al daño celular por estrés oxidativo, su acción protectora es atribuida a sus compuestos antioxidantes como los carotenoides en especial al α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína y criptoxantina. Después del tratamiento el extracto pudo aminorar el efecto perjudicial inducido por el estrés oxidativo en diferentes líneas celulares como células de adenocarcinoma humano HeLa, células de carcinoma hepático humano HepG2 y células de adenocarcinoma de seno humano MCF-7. Estos resultados se debieron probablemente al efecto en conjunto de los compuestos de tomate en defensa de las células al daño por estrés oxidativo⁵⁰.

Por todo lo anteriormente expuesto, con la evidencia que este fruto posee ácidos grasos poliinsaturados de tipo ω -3 (29,2%) y ω -6 (23,5%)⁵¹, compuestos fenólicos además de vitaminas con actividades antimutagénicas y anticarcinógenicas y antioxidantes entre otras, es que se propuso el estudio de la administración experimental del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) con el fin de demostrar el efecto neuroprotector, debido a la ausencia de estudios en este campo.

El resultado de este estudio preclínico aportará bases para el potencial beneficio de personas con riesgo a padecer enfermedad de Alzheimer, además de promover el consumo de un nuevo recurso natural y saludable.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La ingesta del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) presenta efecto neuroprotector frente al daño inducido por cloruro de mercurio en ratones.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto neuroprotector del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) frente al daño inducido por cloruro de mercurio (II) en ratones.

2.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) sobre los marcadores bioquímicos del estrés oxidativo.
- Determinar el efecto del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) sobre la morfología del tejido nervioso.
- Determinar el efecto del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) sobre la función cognitiva en ratones.

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Según Hernández es un estudio de tipo experimental puro, con grupo control y postprueba⁵².

3.2. Muestra

3.2.1. Unidad de análisis

Ratones albinos BALB/c “*Mus musculus*” machos, con tres meses de edad y un peso de 37 ± 7 g aproximadamente.

3.2.2. Tamaño de muestra

42 ratones albinos machos, distribuidos aleatoriamente en seis grupos (n=7).

3.3. VARIABLES

Variable independiente

Zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo): “Líquido sin fermentar que se obtuvo de la parte comestible de frutas en buen estado”⁵³.

Variable dependiente

Neuroprotección: “El término neuroprotección hace referencia al efecto de cualquier sustancia o molécula química o biológica, con efectos protectores en el sistema nervioso que previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos propios de enfermedades o lesiones cerebrales”⁵⁴.

Operacionalización de variables

Variable / Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicadores	Punto de corte	Escala de medida
VI: zumo del fruto <i>Solanum quitoense</i> (lulo) "Líquido no fermentado obtenido por exprimir la pulpa". (codex, 2005)	Líquido no fermentado obtenido del fruto con pepitas y sin piel con extractor eléctrico.	---	Niveles de dosis administradas	<ul style="list-style-type: none"> Dosis baja: 0,5 mL/kg Dosis media: 2 mL/kg Dosis alta: 8 mL/kg 	Intervalo
VD: Neuroprotección "El término neuroprotección hace referencia al efecto de cualquier sustancia o molécula química o biológica, con efectos protectores en el sistema nervioso que previenen, mitigan o retrasan los procesos neurodegenerativos propios de enfermedades o lesiones cerebrales" ⁵⁴ .	Protección morfológica, bioquímica y cognitiva del sistema nervioso (cerebro y cerebelo) producida por el zumo del lulo.	Bioquímica: "Cambios sobre la concentración de metabolitos y actividad enzimática".	<ul style="list-style-type: none"> lipoperoxidación GSH GSH total relación GSH/GSSG actividad SOD actividad catalasa relación SOD/CAT 	Comparado con grupos controles	• Razón
		Morfológica: "Variación en el peso y estructura histológica del cerebro y cerebelo".	<ul style="list-style-type: none"> % de variación del índice cerebro % de variación del índice cerebelo 		• Razón
		Neurofisiológica: Función cognitiva, "proceso cerebral que origina cambios adaptativos en el comportamiento, influenciado por el entorno y el grado de plasticidad neuronal" ⁵⁵ .	Histológico: descripción del tejido.		• Nominal
			Aprendizaje: <ul style="list-style-type: none"> Tiempo de latencia: es el tiempo en minutos que el ratón demora en encontrar el brazo derecho (brazo meta) del laberinto en T. Tiempo de permanencia: es el tiempo en minutos, donde el ratón se queda en el brazo derecho (brazo meta) del laberinto en T. Memoria: <ul style="list-style-type: none"> Número de intentos: es el número de veces que el ratón intenta encontrar el brazo derecho (brazo meta) del laberinto en T. 		• Razón

3.4. Materiales

3.4.1. Materiales biológicos

- Ratones machos *Mus musculus* cepa BALB/c de la variedad albina.
- Fruto *Solanum quitoense* (lulo).

3.4.2. Reactivos químicos

- Reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzoico) o DTNB (Sigma ®)
- Ácido 2-tiobarbitúrico (Sigma ®)
- Ácido tricloroacético (Sigma ®)
- Ácido Etildiaminotetraacético EDTA (titriplex®).
- Cloruro de mercurio (II)
- Etanol, metanol (Spectrum®)
- Vitesol® E 400, cápsula blanda (D-alfatocoferol acetato)
- Pirogalol (ácido pirogálico, C₆H₆O₃) (Merck®)
- Peróxido de hidrógeno (EMSURE®)

3.5. Equipos e instrumentos

- Homogeneizador Ultra Turrax IKA T10 Basic. Dispenser 230 V, 50/60 HZ
- Balanza electrónica Radwg® WTB – 200 Max. 200 g d= 0,001 g
- Espectrofotómetro marca GREETMED; modelo NV 203 – Greetmed
- Centrifuga para tubos – Greetmed Modelo GT119-300
- Baño María AVALIER modelo VL-32
- Estufa marca Unic's®
- Pipeteador de volumen ajustable Kacil

3.6. Recolección del fruto y obtención del zumo

El fruto *Solanum quitoense* “lulo” fue recolectado en el distrito de Oxapampa, Provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (ver Anexo I). Una vez recolectados fueron limpiados, secados y guardados en bolsas de tela de color oscuro, para luego ser trasladados a la ciudad de Lima. Un ejemplar del fruto fue clasificado taxonómicamente por el Museo de Historia Natural de la UNMSM según el N° de registro 27-UNMSM-2018 (ver Anexo II).

El fruto fue seleccionado y lavado, se retiró la cáscara y se cortaron en trozos pequeños, y mediante un extractor eléctrico casero marca Moulinex® se procedió a extraer el zumo el cual fue guardado en recipientes color ámbar, a una temperatura de refrigeración (6° - 8°C), aislado de luz natural o artificial. El procedimiento se realizó todos los días durante el tratamiento.

3.7. Acondicionamiento de la unidad de análisis

Los ratones albinos BALB/c (*Mus musculus*) fueron adquiridos del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud (CNPB/INS) con el certificado sanitario N° 270-2017 (Ver Anexo III), los cuales tuvieron un periodo de aclimatación de siete días en jaulas provistas de rejillas metálicas, en un ambiente controlado de temperatura a 20°C, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con disponibilidad de alimento balanceado que fue adquirido en el Centro de Producción de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y agua *ad libitum*, dichos animales fueron distribuidos en seis grupos (n=7). El presente estudio se realizó siguiendo los principios internacionales del cuidado y manejo de animales establecidos por el INS⁵⁶.

En este periodo se inició con la habituación de los ratones al laberinto en forma de T a través de la exploración a puertas abiertas (Ver anexo VII), durante tres minutos sin recompensa, esto se aplicó uno por uno a los 42 ratones, a esta fase se le conoce como período de reconocimiento del espacio.

3.8. Método de evaluación de la neuroprotección

Para la inducción a la neurotoxicidad se empleó la técnica de Glaser V. y cols., 2010⁵⁷. El cloruro de mercurio (II) o cloruro mercúrico (HgCl_2), fue administrado a la dosis de 10 mg/kg de peso corporal de la unidad de estudio, vía peroral, en una matriz coloidal de almidón al 1% (Ver Anexo IV).

Se inició el proceso de experimentación el cual duró siete días, con la distribución aleatoria de las unidades de estudio en seis grupos (n=7), realizando el siguiente tratamiento vía peroral mediante cánula metálica (Ver Anexo V):

Grupo I: suero fisiológico a 10 mL/kg de peso, una hora después se le administró nuevamente suero fisiológico a la misma dosis.

Grupo II: Suero fisiológico a 10 mL/kg de peso, una hora después se le administró 10 mg/kg de HgCl_2 .

Grupo III: Vitamina E 40 UI/kg, una hora después se le administró 10 mg/kg de HgCl_2 .

Grupo IV: 0,5 mL/kg de *Solanum quitoense* “lulo”, una hora después se le administró 10 mg/kg de HgCl_2 .

Grupo V: 2 mL/kg de *Solanum quitoense* “lulo”, una hora después se le administró 10 mg/kg de HgCl_2 .

Grupo VI: 8 mL/kg de *Solanum quitoense* “lulo”, una hora después se le administró 10 mg/kg de HgCl_2 .

Concluido el tratamiento y tras 10 horas de ayuno, los animales fueron sacrificados por disección para posterior extracción del cerebro y cerebelo, los cuales fueron lavados en cloruro de sodio (NaCl) al 0,9%.

Posteriormente, los hemisferios y el cerebelo fueron separados, el hemisferio izquierdo se conservó en tubos de ensayo a 4°C para el homogenizado, por otro lado, el hemisferio derecho y el cerebelo fueron conservados en solución de formol al 10% y NaCl al 0,9% para el análisis histológico (Ver Anexo VI).

3.9. Preparación del homogenizado

El hemisferio izquierdo fue lavado con NaCl al 0,9%, luego fue secado con papel absorbente para ser pesado en una balanza analítica, en seguida se colocó en un tubo de ensayo para el homogenizado con buffer fosfato de sodio con un pH de 7,4 a 0,01 mol/L, en una proporción de 10/1, posterior a ello se llevó a centrifugar para obtener el sobrenadante (SN).

3.10. Procesamiento de los indicadores

3.10.1. Determinación de los indicadores bioquímicos

Determinación de la Lipoperoxidación. Se utilizó el método de Buege y Aust (1978)⁵⁸ modificado por Suarez (1995)⁵⁹

Fundamento: El malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación de los ácidos grasos perteneciente a las membranas celulares, el cual reacciona con las dos moles del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar un complejo de color rosado que presenta una absorbancia máxima a los 535 nm.

Protocolo: En un tubo con tapa, se colocó 0,4 mL del SN y se agregó 0,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, el cual fue sometido a ebullición en baño María por 10 minutos.

Luego se retiró y enfrió con agua de caño. Posteriormente se le agregó 1,2 mL de TBA al 0,67% en HCl 0,25 N y se llevó nuevamente a baño María por 20 minutos. Concluido el tiempo se dejó enfriar y se llevó a centrifugar por 15 minutos a 3500 rpm.

Determinación de Glutación (GSH) y GSH total⁶⁰

Fundamento: La oxidación del GSH por el ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), produce la formación de una mol de ácido 2-nitro-5- tiobenzoico (TNB) el cual da una coloración amarilla.

Protocolo GSH: Se tomó 1 mL del SN en un tubo y 0,4 mL de TCA al 50 %, se agitó por un periodo de 10 minutos, luego se centrifugó a 3000

RPM por 15 min. Se tomó 0,5 mL del sobrenadante y se agregó 2 mL del buffer TRIS 0,4 mol/L a pH 8,9, luego se colocó a 65°C por 5 minutos, posteriormente se añadió 0,05 mL de DTNB 0,01 mol/L y se mezcló. Finalmente fue leída la muestra a 412 nm.

Protocolo para el GSH total: Se tomó 1 mL del SN en un tubo y 0,4 mL de TCA al 50 %, se agitó por un periodo de 10 minutos, luego se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. Se tomó 0,5 mL del sobrenadante del desproteinizado y se agregó 2 mL del buffer TRIS 0,4 mol/L a pH 8,9 que contenía vitamina C/ácido glioxílico (10 mL de Buffer / 10 mg vitamina C / 5 mg ácido glioxílico), luego se colocó en baño maría a 65°C por 5 minutos, posteriormente se añadió 0,05 mL de DTNB 0,01 mol/L y se mezcló. Finalmente fue leída la muestra a 412 nm.

La concentración de GSH oxidado (GSSG) se determinó por la diferencia entre GSH total y GSH.

Determinación de Superóxido dismutasa (SOD) según Marklund y Marklund (1974)⁶¹

Fundamento: Se basa en la autooxidación del pirogalol en medio básico tras generarse el radical superóxido (O_2^-). La presencia de un secuestrador del radical inhibe la reacción de autooxidación del pirogalol.

Protocolo: La inhibición de la autooxidación del pirogalol se determinó con 1720 μ L de Buffer tris HCl 0,05 M, pH 8,2 (que contiene DTPA 1mM) más 100 μ L del homogenizado. Se llevaron las muestras a baño María a 37°C por 1 minuto para luego agregar 180 μ L de pirogalol 2mM (en HCl 0,01N). Se leyeron las absorbancias a 420 nm en intervalos de 1 minuto hasta cumplir 4 minutos en el espectrofotómetro.

Determinación de Catalasa (CAT) según Aebi⁶²

Fundamento: El método se fundamenta en la descomposición del H₂O₂ catalizada por la enzima catalasa medida por espectrofotometría UV a 240 nm.

$$2 \text{ H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$$

Protocolo: Se empleó el sobrenadante, se diluyó en una proporción de 1/60. De esto se tomó 0,7mL más 0,3 mL de H₂O₂ 30 mmol/L. La descomposición del H₂O₂ fue medida por decrecimiento de la absorbancia a 240 nm cada 15s durante 2 min.

3.10.2. Determinación de los indicadores morfológicos según referencia Sandoval M.⁶³

Índice de cerebro⁶³: Se realizó la disección craneal para extraer el cerebro, el cual fue lavado en solución fisiológica (NaCl 0,9%) y fue secado en papel absorbente. Posteriormente se pesó el órgano en una balanza analítica para determinar el índice de cerebro y % de inhibición. Se diseccionó el hemisferio izquierdo y se conservó a una temperatura de 4°C para su posterior análisis bioquímico.

$$\text{índice de cerebro} = \frac{W_{\text{cerebro}}}{W_{\text{animal}}} \times 100$$

W = peso

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{IC_{G2} - IC_{GTTO}}{IC_{G2}} \times 100$$

ICG2= Índice cerebro grupo II

ICGTTO=Índice cerebro del tratamiento

Índice de cerebelo⁶³: Se realizó la disección craneal para extraer el cerebelo, el cual fue lavado en solución fisiológica de NaCl al 0,9% y fue secado en papel absorbente. Posteriormente se pesó el órgano en una balanza analítica para determinar el índice de cerebelo y % de inhibición. Se conservó a una temperatura de 4°C para su posterior análisis.

$$\text{índice de cerebello} = \frac{W_{\text{cerebello}}}{W_{\text{animal}}} \times 100$$

W = peso

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{IC_{G2} - IC_{GTT0}}{IC_{G2}} \times 100$$

ICG2= Índice cerebello grupo II (control positivo)

ICGTT0=Índice cerebello del tratamiento

3.10.3. Análisis de los cortes histológicos

Para el estudio histológico se empleó el hemisferio derecho del cerebro y el cerebello, los cuales fueron conservados en formol al 10% tamponado en buffer fosfato con pH 7,4 a 0,075 mol/L, las muestras fueron fijadas en parafina y teñidas con hematoxilina eosina por un profesional tecnólogo médico de laboratorio clínico. Los cortes histológicos de tejido de nervioso (cerebro y cerebello) fueron leídos por un Médico Anatómo Patólogo, el cual evaluó en el cerebro el núcleo, nucléolo y citoplasma de las neuronas piramidales, neuroglías y en el cerebello las células de Purkinje.

3.10.4. Evaluación de la función cognitiva

Para la evaluación de aprendizaje y memoria en ratones se empleó el laberinto en T según el protocolo de Deacon R y Rawlis N⁶⁴, el cual se realizó durante siete días a la par con el método de inducción a neurotoxicidad. Durante este periodo se minimizó cualquier estrés ya sea durante la limpieza de las jaulas como al momento de manipularlos, para ello se incentivó a que suban a la mano del investigador de forma voluntaria. Cabe resaltar que el procedimiento se llevó a cabo en un ambiente donde no se encontraban los otros animales de experimentación, esto es para minimizar el estrés de los animales en reposo. Las dimensiones del laberinto fueron de 30 cm de largo x10 cm de ancho y 15 cm de alto para ambos brazos y el brazo de inicio (Ver Anexo VII), según protocolo. Para la prueba de aprendizaje se tomaron en cuenta los tiempos de latencia y permanencia; por otro lado, para la prueba de memoria se tomó en cuenta el número de intentos que le tomó al animal para llegar al brazo meta.

Al iniciar el tratamiento, el cual duró siete días, los cuatro primeros días fueron de adaptación, esto consistió en primer lugar, en el bloqueo del brazo izquierdo con la puerta deslizante, mientras que el brazo derecho (brazo meta) se dejó libre y con recompensa (comida balanceada). Posteriormente se colocó al animal en el punto de inicio para que este recorra el laberinto, se tomó el tiempo en que el animal demoró en llegar al brazo meta y se esperó a que terminara la comida, para luego ser retirado con sumo cuidado.

Culminado el período de adaptación, se inició con el período de prueba, el cual duró tres días. En esta fase se dejaron libres ambos brazos y no se dejó recompensa. Se colocó al animal en el punto de inicio, dejando que este recorra el laberinto, se tomaron anotaciones del tiempo en que el animal de experimentación tardó en llegar al brazo meta (aprendizaje), el tiempo en que permaneció en dicho brazo (aprendizaje) y el número de intentos que le tomó llegar al brazo meta (memoria), posterior a ello fue retirado del laberinto y colocado en su jaula.

3.11. Análisis de datos estadísticos

Los datos obtenidos del estudio experimental fueron digitados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2016. Luego fueron procesados mediante el programa estadístico SPSS versión 24.0. Para conocer la distribución de los ensayos, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro Wilk.

Para el caso de los ensayos que presentaron una distribución normal se aplicó la prueba de ANOVA con el análisis post hoc Tukey, para la comparación de medias para más de dos muestras independientes; por el contrario, para las pruebas que no presentaron distribución normal se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con el análisis post hoc U de Mann Whitney, por la vía de corrección de Bonferroni.

3.12. Consideraciones éticas

En la investigación se tuvo en cuenta la Ley Peruana N°30407 de la protección y bienestar animal. En la cual se especifica que está permitida la experimentación para el estudio y el avance de la ciencia, cuando resulte necesario para el tratamiento de enfermedades que afecten tanto al hombre como a los animales⁶⁵.

Además, se siguió el principio de las tres R's de la experimentación humanizada para con los animales la investigación biomédica en animales siendo éticamente aceptable, esta fue propuesta por William Russell y Rex Burch en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar⁶⁶, las cuales fueron consideradas en la investigación.

IV. RESULTADOS

Se aplicó la prueba Shapiro Wilk, el cual determinó que los indicadores con distribución simétrica fueron el índice de cerebro y cerebelo, GSH Y GHS TOTAL y actividad de catalasa) y los indicadores con distribución asimétrica fueron lipoperoxidación, relación GSH/GSSG, actividad de SOD, relación SOD/CAT e indicadores de la evaluación cognitiva.

4.1. Niveles de lipoperoxidación en el tejido cerebral

En el grupo II Se observó un mayor nivel de lipoperoxidación frente al grupo I ($p<0,01$). El grupo III presentó niveles similares al grupo II.

Los grupos IV, V y VI, presentaron niveles de inhibición (49,2%, 45,0% y 52,5% respectivamente) respecto al grupo II, con diferencias ($p<0,01$).

Tabla 1: Niveles de lipoperoxidación en el tejido cerebral según grupos

GRUPOS	Lipoperoxidación*	
	nmol/g**	% inhibición
Grupo I	89 ± 26,4 ^(a)	---
Grupo II	177 ± 34,6	---
Grupo III	175,4 ± 13,5	0,9
Grupo IV	90 ± 14,4 ^(a)	49,2
Grupo V	97,4 ± 15,2 ^(a)	45,0
Grupo VI	84,08 ± 9,5 ^(a)	52,5

*Prueba Shapiro Wilk $p<0,05$. Prueba KRUSKAL WALLIS.

** MEDIANA ± RIQ

(a) $p<0,01$ comparado con el grupo II

4.2. Perfil de GSH en tejido cerebral

Se evidenció un mayor nivel de GSH para los grupos V (2 mL/kg) y VI (8 mL/kg) en comparación al grupo II sin llegar a ser significativo.

En cuanto a la relación de GSH/GSSG se evidenció un incremento para los grupos V (2 mL/kg) y VI (8 mL/kg), presentando porcentajes de inhibición de 111,03% y 95,3% respectivamente, con diferencias ($p < 0,01$) en comparación al grupo II.

Tabla 2: Niveles de perfil de GSH en tejido cerebral según grupos

GRUPO	GSH Red*		GSH T*		GSH/GSSG**	
	mmol/g ***	% incremento	mmol/g ***	% incremento	mmol/g ****	% incremento
Grupo I	2,2 ± 0,5	---	9,9 ± 2,4 ^(a)	---	0,29 ± 0,15 ^(b)	---
Grupo II	2,0 ± 0,4	---	15,2 ± 2,2	---	0,15 ± 0,04	---
Grupo III	2,1 ± 0,3	2,3	8,9 ± 1,1 ^(b)	-41,1	0,28 ± 0,10 ^(b)	85,2
Grupo IV	1,6 ± 0,4	-22,4	11,1 ± 3,3	-27,1	0,17 ± 0,04	14,0
Grupo V	2,8 ± 0,7 ^(a)	38,8	12,7 ± 4,2	-16,1	0,32 ± 0,24 ^(b)	111,03
Grupo VI	2,7 ± 0,4	32,0	12,6 ± 1,9	-17,0	0,29 ± 0,15 ^(b)	95,3

* Prueba Shapiro Wilk $p < 0,05$. Prueba ANOVA.

**Prueba Shapiro Wilk $p < 0,05$. Prueba KRUSKAL WALLIS.

***MEDIA ± DE

****MEDIANA ± RIQ

(a) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

4.3. Actividad de superóxido dismutasa y catalasa

Se observó una mayor actividad de SOD en el grupo III (Vitamina E) en comparación al grupo II, siendo no significativa.

En cuanto a la enzima Catalasa, se evidenció que el grupo I tuvo un incremento de dicha enzima en comparación con el grupo II, de manera significativa ($p < 0,05$). En los grupos IV, V y VI se observó un incremento marcado de la actividad de catalasa, presentando porcentajes de 106,1%, 51,0% y 83,7% respectivamente, con diferencia significativa ($p < 0,05$) en comparación con el grupo II.

En la relación SOD/CAT se apreció una disminución en la actividad del grupo I comparado con el grupo II de manera significativa ($p < 0,05$). Para los grupos IV (0,5 mL/kg), V (2 mL/kg) y VI (8 mL/kg) se observó una marcada disminución en comparación al grupo II con diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 3: Actividad de superóxido dismutasa, catalasa y su relación en tejido cerebral según grupos

GRUPOS	SOD**		CAT*		SOD/CAT**	
	U/mg****	% incremento	U/mg***	% incremento	U/mg****	% inhibición
Grupo I	6,03 ± 0,66	---	0,87 ± 0,08 ^(a)	---	6,63 ± 0,98 ^(a)	---
Grupo II	6,79 ± 1,05	---	0,49 ± 0,08	---	12,79 ± 5,20	---
Grupo III	7,27 ± 0,85	7,1	0,47 ± 0,08	-4,1	15,05 ± 4,96	-17,7
Grupo IV	6,33 ± 0,80	-6,8	1,01 ± 0,13 ^(a)	106,1	6,26 ± 1,49 ^(a)	51,1
Grupo V	5,78 ± 0,29	-14,9	0,74 ± 0,10 ^(a)	51,0	8,44 ± 1,50 ^(a)	34,0
Grupo VI	6,01 ± 0,65	-11,5	0,90 ± 0,18 ^(a)	83,7	6,46 ± 3,48 ^(a)	49,5

* Prueba Shapiro Wilk $p < 0,05$. Prueba ANOVA.

**Prueba Shapiro Wilk $p < 0,05$. Prueba KRUSKALL WALLIS.

*** MEDIA ± DE

****MEDIANA ± RIQ

(a) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

4.4. Índice de cerebro y cerebelo

Se observó que la administración de cloruro de mercurio (grupo II) produjo un mayor porcentaje de índice de cerebro y cerebelo comparado al grupo I, siendo este incremento significativo para el primero.

El grupo III (Vitamina E + HgCl₂) presentó un menor porcentaje de índice de cerebro frente al grupo II, sin embargo, el índice de cerebelo no mostró diferencia respecto al grupo II.

Inducido el daño con cloruro de mercurio en los grupos IV, V y VI, y tras el tratamiento con zumo del fruto lulo, se observó un menor porcentaje de índice de cerebro expresando una inhibición de 5,4%, 10,0% y 11,3% respectivamente, en comparación al grupo II siendo significativo solo en los grupos V (2 mL/kg) y VI (8 mL/kg). En cuanto al nivel de índice de cerebelo se observó una disminución en comparación con el grupo II, sin llegar a ser significativa en ninguno de los casos.

Tabla 4: Porcentaje de Índice de cerebro y cerebelo según grupos

GRUPOS	Índice de cerebro*		Índice de cerebelo*	
	%**	% inhibición	%**	% inhibición
Grupo I	0,85 ± 0,02 ^(a)	---	0,17 ± 0,01	---
Grupo II	0,94 ± 0,09	---	0,19 ± 0,01	---
Grupo III	0,86 ± 0,07	8,3	0,19 ± 0,02	- 0,7
Grupo IV	0,89 ± 0,03	5,4	0,17 ± 0,02	10,2
Grupo V	0,85 ± 0,03 ^(a)	10,0	0,18 ± 0,02	4,2
Grupo VI	0,83 ± 0,05 ^(b)	11,3	0,18 ± 0,01	4,6

* Prueba Shapiro-Wilk $p < 0,05$. Prueba ANOVA.

**MEDIA ± DE (desviación estándar)

(a) $p < 0,05$ comparado con el grupo II

(b) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

4.5. Descripción histológica del tejido neuronal

El estudio a nivel histológico de los tejidos del cerebro y cerebelo de los ratones con daño cerebral identifico la presencia de:

Grupo I: En las muestras de cerebro se apreció un espacio subaracnoideo bien distribuido con vasos sanguíneos presentes y conservados. En la capa cortical se apreció el neurópilo, el cual no presentó alteraciones; la neurona presentó un citoplasma bien distribuido, un núcleo con cromatina fina y nucléolo presente; las células piramidales o células de Betz presentaron citoplasma escaso y bien distribuido. En la capa medular se observó halo periférico con leve edema; su componente vascular se encontró bien distribuido, pero ligeramente congestivo. En las muestras de cerebelo se apreció la capa molecular con abundantes células y bien distribuidas, el neurópilo presentó leve edema; en la capa de células de Purkinje se apreció una membrana citoplasmática bien distribuida, con halo perinuclear y nucléolo presente; la capa granular se encontró bien distribuida, pero con edema; el componente vascular se encontró con buena distribución y ligeramente congestivo.

Grupo II: En las muestras de cerebro se apreció un espacio subaracnoideo con presencia de células polimorfonucleares y linfocitos perivascuales. En la capa cortical se apreció el neurópilo, el cual presentó ligeramente edema a nivel granular; la neurona presentó halo a su alrededor y eosinofilia a nivel citoplasmático; las células piramidales o células de Betz presentaron ligero edema en el citoplasma. En la capa medular se observó edema a nivel del neuropilo; se apreció ligera congestión a nivel de los vasos sanguíneos. En las muestras de cerebelo se apreció la capa molecular, cuyas células presentaron citoplasma con eosinofilia e hipercromatismo; el neurópilo presentó hematíes atrapados con degeneración en la membrana citoplasmática; en la capa de células de Purkinje se apreció edema con refuerzo de membrana citoplasmática y leve eosinofilia, también se evidenció citolisis; la capa granular presentó algunas células con hipercromatismo nuclear; el componente vascular manifestó congestión.

Grupo III: En las muestras de cerebro se apreció un espacio subaracnoideo con vasos sanguíneos ligeramente congestivos e infiltrado de linfocitos. En la capa cortical se apreció el neurópilo disminuido a nivel perineuronal; en la neurona se apreció leve halo pericitoplasmático y algunas con eosinofilia; las células piramidales o células de Betz se encontraron agrupadas con células gliales, hipercromáticas con edema. En la capa medular se observaron algunas células con edema; su componente vascular se encuentra sin alteración. En las muestras de cerebelo se apreció la capa molecular, la cual presentó neuronas con leve edema citoplasmático, el neurópilo se encontró bien

distribuido; en la capa de células de Purkinje se apreció eosinofilia citoplasmática con edema; la capa granular se encontró bien distribuida y conservada; el componente vascular se encontró ligeramente congestivo.

Grupo IV: En las muestras de cerebro se apreció un espacio subaracnoideo con vasos sanguíneos congestivos y algunos pletóricos, con infiltrado de linfocitos y plasmocitos. En la capa cortical se encontró el neurópilo sin alteraciones; algunas neuronas presentaron edema severo y marcada eosinofilia bien distribuida; se observó también las células piramidales o células de Betz escasas y bien distribuidas. En la capa medular se encontraron células con eosinofilia bien marcada; su componente vascular se encontró bien distribuido y sin alteraciones. En las muestras de cerebelo se apreció la capa molecular con leve edema en las neuronas, el neurópilo se encontró sin alteraciones; en la capa de células de Purkinje se apreció una marcada eosinofilia intracitoplasmática con edema y desaparición de núcleo; en la capa granular se encontró multicelularidad bien distribuida; el componente vascular presentó congestión a nivel intraparenquimal.

Grupo V: En las muestras de cerebro se apreció un espacio subaracnoideo con escasas células polimorfonucleares y linfocitos a nivel perivascular. En la capa cortical se apreció el neurópilo con leve edema y focos de necrosis; se encontró escasas de neuronas; las células piramidales o células de Betz se encontraron agrupadas con células gliales alrededor de los focos necróticos. En la capa medular se observó escasa celularidad neuronal y glial; su componente vascular se encontró levemente congestivo a predominio del espacio subaracnoides. En las muestras de cerebelo se aprecia la capa molecular con algunas células que presentaron leve eosinofilia multifocal, el neurópilo bien conservado; en la capa de células de Purkinje se apreció arrugamiento de la membrana nuclear, leve edema citoplasmático y presencia de eosinofilia; la capa granular presentó algunas células con apoptosis; el componente vascular se encontró ligeramente congestivo.

Grupo VI: En las muestras de cerebro se apreció un espacio subaracnoideo con presencia de células polimorfonucleares, algunos linfocitos y hematíes. En la capa cortical se apreció el neurópilo, el cual se aprecia bien definido con edema escaso; se observaron abundantes neuronas y células gliales. En la capa medular se observó hiper celularidad con células gliales bien distribuidas; su componente vascular se presentó con proliferación tanto a nivel cortical como medular. En las muestras de cerebelo se apreció la capa molecular con células bien distribuidas, el neurópilo sin alteraciones y bien distribuido; en la capa de células de Purkinje se apreció que algunas

tenían marcada eosinofilia en forma focal, otras pequeñas y con edema a nivel citoplasmático; la capa granular se encontró formando grupos con marcada hiper celularidad; el componente vascular se encontró sin alteraciones.

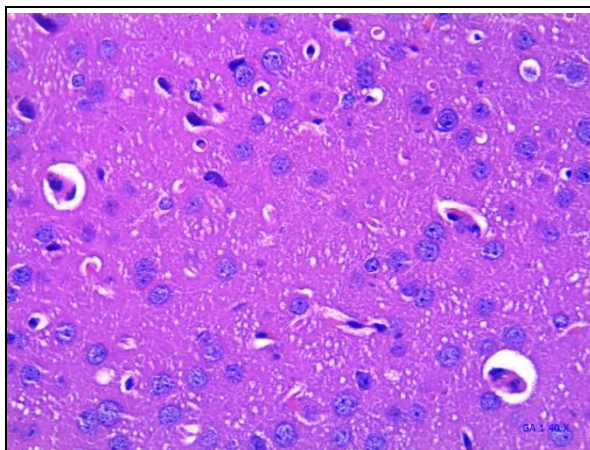


Figura 1. Grupo I: se observa la corteza del cerebro sin alteración morfológica. HE (40X).

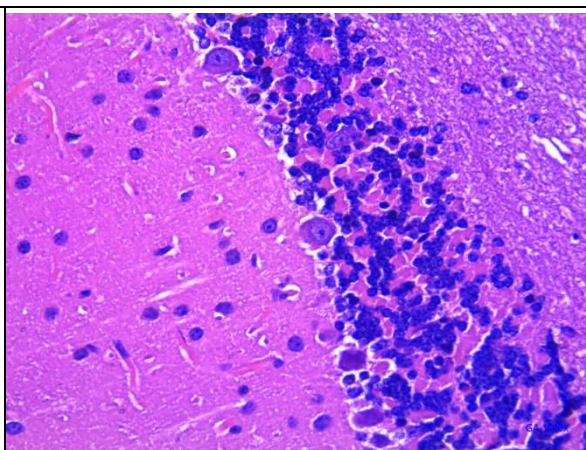


Figura 2. Grupo I: se observan las capas del cerebelo sin alteración morfológica. HE (40X).

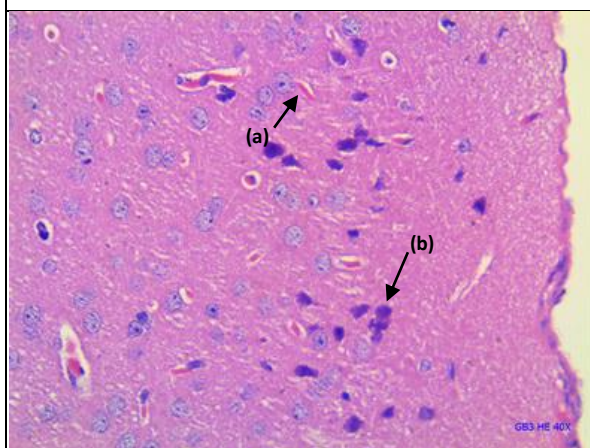


Figura 3. Grupo II: Cerebro. Se observa en la corteza del cerebro (a) vasos congestionados y (b) neuronas con edema y eosinofilia. HE (40X).

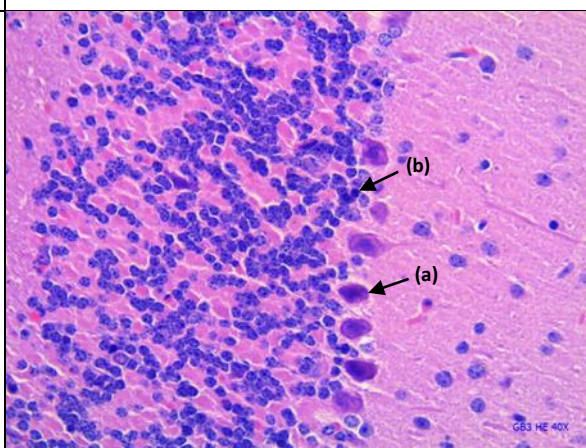


Figura 4. Grupo II: Cerebelo. (a) Células de Purkinje con edema y eosinofilia. (b) Capa granular con hiper cromatismo nuclear. HE (40X).

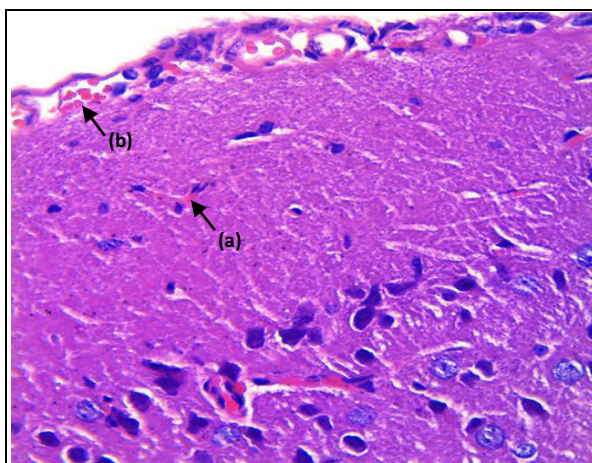


Figura 5. Grupo III: cerebro. Se observa el espacio subaracnoideo con (a) vasos sanguíneos ligeramente congestivos e (b) infiltración de linfocitos. HE (40X).

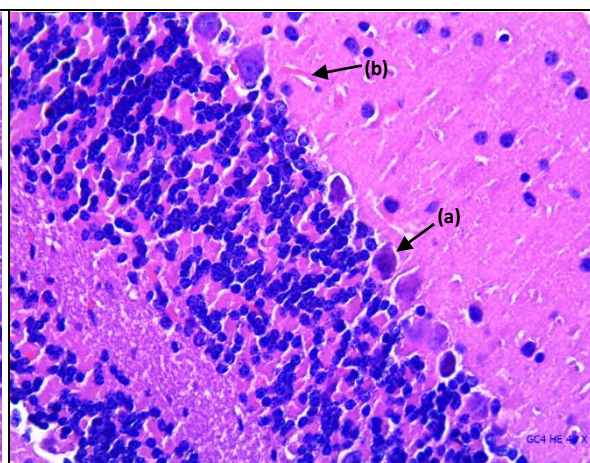


Figura 6. Grupo III: Cerebelo. (a) Células de Purkinje con edema y eosinofilia plasmática. (b) Vasos sanguíneos ligeramente congestivos. HE (40X).

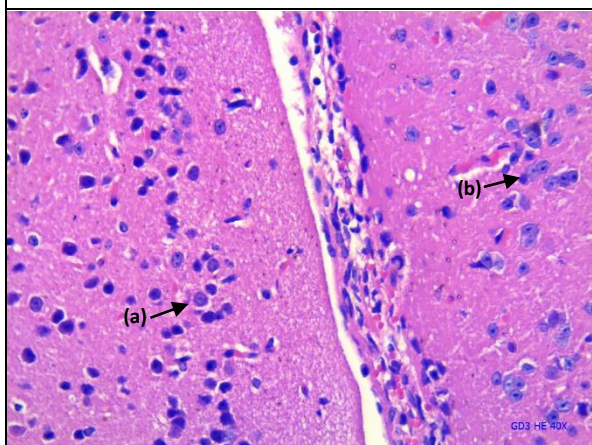


Figura 7. Grupo IV: Cerebro. Se observa (a) células con eosinofilia y edema. (b) células de Betz escasas. HE (40X).

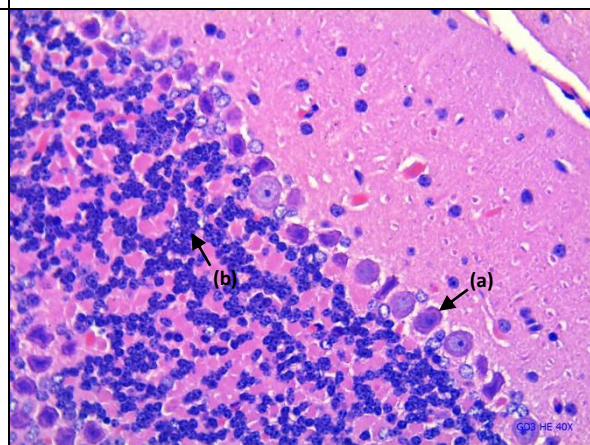


Figura 8. Grupo IV: Cerebelo. Se observa (a) células de Purkinje con eosinofilia y la (b) capa granular con multicelularidad bien distribuida. HE (40X).

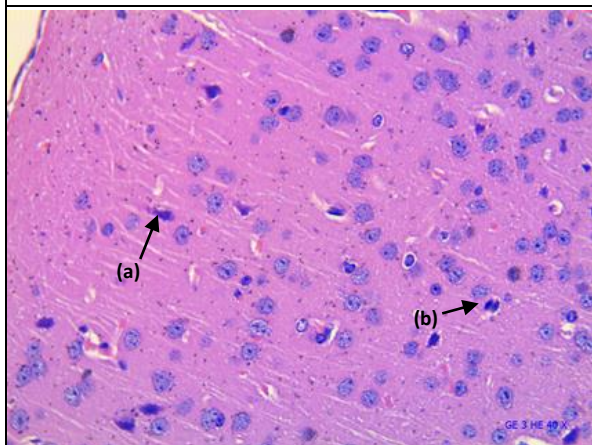


Figura 9. Grupo V: Cerebro. Se observa (a) leve edema en el neuropilo y (b) células de Betz agrupadas con células gliales alrededor de focos necróticos. HE (40X).

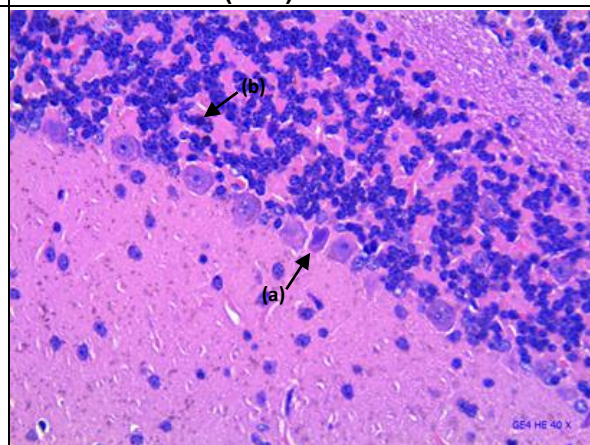


Figura 10. Grupo V: Cerebelo. (a) Células de Purkinje con leve eosinofilia y (b) células con apoptosis. HE (40X).

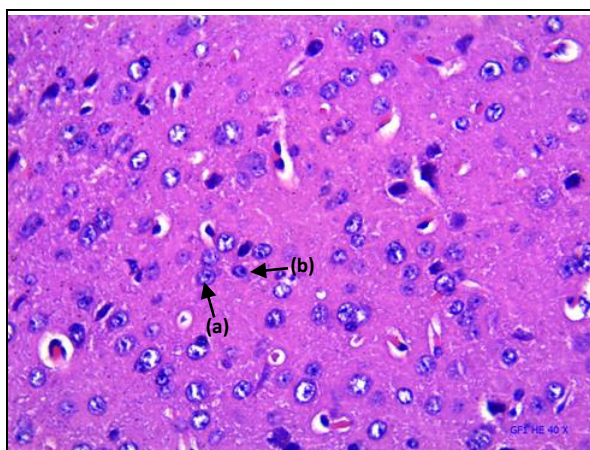


Figura 11. Grupo VI: Cerebro. Se observa abundantes (a) neuronas y (b) células gliales. HE (40X).

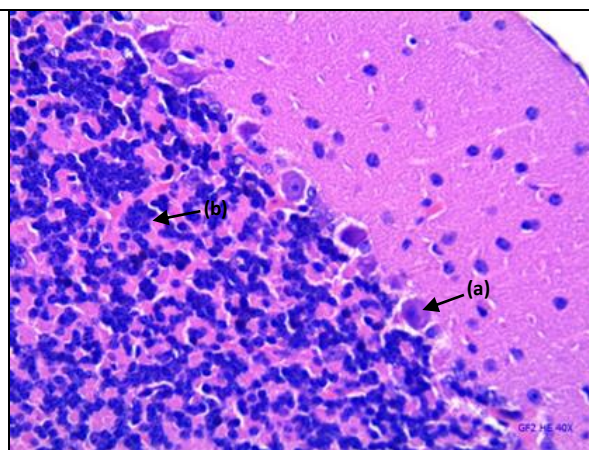


Figura 12. Grupo VI: Cerebelo. Se observa (a) células de Purkinje con eosinofilia y (b) la capa granular grupos con marcada hipercelularidad. HE (40X).

4.6. Evaluación Cognitiva

Se observó que la administración de cloruro de mercurio (HgCl_2) produjo un mayor tiempo de latencia y un menor número de intentos (grupo II) comparado al grupo I, siendo estas diferencias significativas en ambos casos ($p < 0,01$).

Inducido el daño con cloruro de mercurio (II) en los grupos IV, V y VI, y tras el tratamiento con zumo del fruto lulo a diferentes dosis, se observó un menor tiempo de latencia y menor número de intentos, en comparación al grupo II siendo significativo ($p < 0,01$) en todos los grupos.

Tabla 5: Indicadores de aprendizaje y memoria según grupos

GRUPOS	Indicador de aprendizaje		Indicador de memoria
	Tiempo de Latencia* min**	Tiempo de Permanencia* min**	Nº de Intentos*
Grupo I	$6,64 \pm 3,50^{(a)}$	$11,47 \pm 1,38$	$1,05 \pm 0,00^{(a)}$
Grupo II	$19,55 \pm 7,64$	$8,29 \pm 3,66$	$2,62 \pm 1,00$
Grupo III	$10,92 \pm 6,41$	$13,56 \pm 8,51$	$1,24 \pm 0,67^{(a)}$
Grupo IV	$4,41 \pm 0,91^{(a)}$	$12,45 \pm 6,22$	$1,00 \pm 0,00^{(a)}$
Grupo V	$3,21 \pm 1,48^{(a)}$	$15,35 \pm 11,97$	$1,00 \pm 0,00^{(a)}$
Grupo VI	$2,98 \pm 0,46^{(a)}$	$21,46 \pm 7,26^{(a)}$	$1,00 \pm 0,00^{(a)}$

* Shapiro Wilk $p < 0,05$. Prueba KRUSKAL WALLIS.

** MEDIANA \pm RIQ

(a) $p < 0,01$ comparado con el grupo II

V. DISCUSIÓN

Los alimentos además de contener nutrientes y energía, proporcionan bienestar; además, nos aportan compuestos que favorecen a las acciones fisiológicas en el organismo. Estas propiedades que se denominan saludables o funcionales son atribuidas a compuestos químicos “bioactivos”. Debido a ello se ha convertido en un tema que ha despertado el interés de los investigadores, los consumidores y la industria agroalimentaria durante muchos años⁶⁷.

Actualmente, existe una preferencia de los consumidores hacia una alimentación más saludable por lo que la demanda de estos productos naturales y funcionales es cada vez mayor⁶⁸. En este contexto, es importante que mediante mensajes dirigidos al consumidor se promocióne los beneficios para la salud, asegurándonos que tengan un respaldo científico de las bondades que se le atribuyen⁶⁷.

En el presente estudio se encontró que, al grupo que se le administró cloruro de mercurio (HgCl_2) a 10 mg/kg (grupo II) presentó mayores niveles en los indicadores de lipoperoxidación, relación SOD/CAT, índice de cerebro, índice de cerebelo, tiempo de latencia y número de intentos, por el contrario, presentó un menor nivel en la relación GSH/GSSG. Histológicamente en el cerebro se evidenció presencia de células polimorfonucleares y linfocitos, edema, eosinofilia y congestión; en el cerebelo se encontró eosinofilia, hiperchromatismo, edema, citolisis y congestión.

Los resultados anteriormente citados están relacionados al metabolismo de HgCl_2 que induce a una sobrecarga de radicales libres (RL) desencadenando estrés oxidativo (EO) en el organismo, esto se debe a que el sistema antioxidante pierde la capacidad de compensar la alta producción de RL inducidos por la exposición a este metal, además genera daño celular debido a su predisposición de unión con grupos sulfhídricos(-SH) y lipídicos lo que causa cambios funcionales y conformacionales que conllevan a la lipoperoxidación^{36,69}.

Debido a que el daño producido por los EROs afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, principalmente de los fosfolípidos de la membrana celular, se origina el proceso de peroxidación lipídica, teniendo productos finales como los aldehídos, gases hidrocarbonados y otros residuos químicos, incluido el malondialdehído^{70, 71}, este suceso podría explicar el incremento de los niveles de lipoperoxidación en el grupo II.

Dentro de los efectos tóxicos del HgCl_2 en el cerebro se encuentra el exceso en la producción de RL, los cuales ocasionan que el organismo promueva la síntesis de enzimas antioxidantes como la SOD, esta enzima se encarga de catalizar la dismutación del O_2^{\bullet} a H_2O_2 , este último producto será degradado por otras enzimas como la catalasa, la cual descompone al H_2O_2 en H_2O y O_2 , la injuria por el HgCl_2 actúa a nivel de enzimas esenciales como la catalasa inhibiendo su actividad^{36, 72, 73}, esto se vería reflejado en la disminución de la actividad de la catalasa y aumento en la relación de SOD/CAT en el grupo II.

El SNC capta al HgCl_2 produciendo una rápida disminución en la actividad de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa, la cual mantiene el potencial de reposo y regula el volumen celular, esto ocasiona que la concentración intracelular del Na^+ aumente, seguida de un aumento gradual en la concentración del Ca^{2+} intracelular, permitiendo el ingreso de agua en el espacio intracelular para mantener el equilibrio osmótico lo que conlleva a la formación de edema, otra posible vía, se le atribuye al proceso de lipoperoxidación, ya que al ser los lípidos los componentes principales de la membrana celular, por consecuencia se van a ver alteradas las funciones secretoras, la flexibilidad y permeabilidad de dicha membrana; por otro lado, los productos de degradación de la lipoperoxidación pueden influir también sobre la permeabilidad vascular, producir inflamación y edema^{33, 70, 71, 74, 75, 76}. Estos eventos pueden estar relacionados a los niveles elevados del índice de cerebro, índice de cerebelo y examen histológico en el grupo II.

El endotelio vascular es altamente sensible al estrés oxidativo causado por el HgCl_2 , al interactuar el óxido nítrico (NO) con el anión superóxido (O_2^{\bullet}) forma peroxinitrito, disminuyendo la disponibilidad del NO para la relajación del músculo liso, esto conllevaría a la vasoconstricción de arterias y venas disminuyendo el flujo sanguíneo, lo que provoca isquemia impidiendo la disponibilidad de O_2 y nutrientes en la célula⁷⁷, lo que podría estar relacionado a la congestión al examen histológico del grupo II.

El HgCl_2 induce a la activación del factor nuclear κB (NF- κB), que es un factor de transcripción el cual sirve como mediador de la expresión de una variedad de genes implicados en las respuestas inmunes e inflamatorias. Esta activación de NF- κB promueve cuantiosos productos de genes proinflamatorios que incluyen citocinas, ciclooxygenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)⁷⁸. Estos resultados

se pueden ver reflejados en el aumento de eosinófilos e hipercromatismo en la neurona mostrados en el examen histológico del grupo II.

Una posible vía de ingreso del HgCl_2 al tejido nervioso parece ser a través del músculo esquelético y las uniones neuromusculares, para finalmente, ser transportado retrógradamente a los cuerpos celulares de las neuronas motoras inferiores por sus axones. Considerando la alta afinidad de unión que existe entre los compuestos de mercurio y el azufre, las interacciones de mercurio con proteínas en el SNC podrían explicar algunos de sus efectos sobre la neurotransmisión. Por lo tanto, las concentraciones micromolares de mercurio actuarían inhibiendo los sistemas colinérgicos, glutamatérgicos, GABAérgicos y dopaminérgicos, afectando tanto el comportamiento como la cognición^{79, 80, 81, 82, 83}.

Las discapacidades conductuales están relacionadas, por una parte, con el contenido de mercurio almacenado a nivel cortical e hipocámpal el cual interfiere con la homeostasis. Está bien determinado que los procesos cognitivos y motivacionales obedecen a las conexiones entre corteza pre-frontal y las estructuras límbicas, las cuales dependen de los neurotransmisores mencionados anteriormente, y el hipocampo juega un papel clave en el funcionamiento de estas vías³¹. Esto se podría asociar al mayor tiempo que demoró el grupo II en encontrar el brazo meta (tiempo de latencia) que está asociado al aprendizaje y al mayor número de intentos que le tomó encontrar el brazo meta asociado a la memoria, evidenciando afección en los procesos cognitivos.

Una de las vías por la cual el GSH se vería afectado, sería la fijación del mercurio al grupo tiol (-SH) de la cisteína, la cual se sabe que forma parte de la estructura del glutatión, siendo este efecto un factor limitante para su capacidad antioxidante^{84, 85, 86, 87}. Por otro lado, el producto final de la oxidación de GSH es el glutatión oxidado (GSSG), este será reducido por la glutatión reductasa (GR), la cual utiliza el NADPH, proveniente de la vía de la pentosa fosfato, como donador de electrones, conservando de esta manera la proporción de GSH/GSSG. El mercurio actúa inhibiendo la actividad del GR, al inhibir esta enzima, el GSSG se acumula a expensas de los niveles de GSH, también actúa inhibiendo la enzima glutatión peroxidasa (GPx), enzima que dismuta el peróxido de hidrógeno, empleando GSH y convirtiéndolo en GSSG⁸⁸, esto podría explicar porque la proporción de GSH/GSSG fue menor en el grupo II.

Teixeira 2014, reportó que tras la intoxicación por HgCl_2 en ratas se promovió el daño funcional e indujo a respuestas como la ansiedad, problemas de memoria a corto y largo plazo y déficits motores, esto fue evaluado por diferentes pruebas (campo abierto, reconocimiento social y laberinto en T). Además de ello se demostró que el HgCl_2 tiene más afinidad por la corteza, conllevando a una acumulación en esa zona. El HgCl_2 también indujo al deterioro del aprendizaje motor y de la coordinación, los estudios de neurodesarrollo señalaron que la exposición al HgCl_2 en los primeros días postnatales provocó alteraciones en la función motora y la fuerza muscular, así como descensos en las actividades locomotoras y exploratorias³¹. Esto se asemeja con lo encontrado en nuestra investigación, donde se observó problemas en la memoria de los ratones evaluados para este grupo, y en la parte histológica se encontró mayor daño a nivel de la corteza.

En el estudio de Moneim 2015 se indujo a neurotoxicidad y estrés oxidativo con HgCl_2 , los resultados mostraron un nivel elevado de lipoperoxidación, lo que indica una sobreproducción de radicales libres y productos peroxidativos lipídicos. Por otro lado, la administración de HgCl_2 causó una significativa disminución de GSH, debido a la interacción con el grupo Tiol de GSH, dirigiendo a la formación de un complejo irreversible de GS-HgCH_3 . También se encontró inhibición en las enzimas SOD y CAT en el cerebro, debido al aumento del estrés oxidativo⁸⁸. Lo descrito es similar a los resultados encontrados en el grupo II donde se encontró niveles elevados de lipoperoxidación, disminución de GSH y CAT.

El grupo que recibió Vitamina E más HgCl_2 (grupo III) presentó, luego de siete días, niveles elevados de lipoperoxidación, de la relación GSH/GSSG, índice de cerebelo y tiempo de latencia. Se observó también mayor nivel en la relación SOD/CAT, sin embargo, el nivel de índice de cerebro y número de intentos fueron bajos. Histológicamente en el cerebro se evidenció presencia de vasos congestivos, infiltrado de linfocitos, eosinofilia, hipercromáticas y edema; en el cerebelo se encontró edema, eosinofilia, y ligera congestión.

El α -tocoferol posee la mayor biodisponibilidad en humanos y puede cruzar la barrera hematoencefálica y acumularse en el cerebro. Posee una gran capacidad antioxidante la cual se le atribuye a su anillo cromano, actúa eliminando daños oxidativos en membranas, lipoproteínas y tejidos, mediante su grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) fenólico, que es capaz de neutralizar al O_2 , capturar radicales libre hidroxilo (HO^\bullet) y

aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y neutralizar peroxilos^{89, 90, 91}. El α -tocoferol es el principal antioxidante liposoluble, el cual protege los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de los fosfolípidos de la membrana, frente al daño mediado por el radical peroxilo (ROO^{\bullet}), esto se debe a que este radical presenta una alta afinidad por este vitámero, que por los AGPI. Asimismo, el α -tocoferol es convertido a radical tocoferoxilo, el cual puede restablecerse al ser reducido por el ácido ascórbico, GSH o algún otro donador hidrosoluble de electrones, y de esa manera continuar ejerciendo su función⁷². Esto podría estar relacionado con el incremento de GSH/GSSG que presentó el grupo III.

Por otro lado, la vitamina E puede tener un comportamiento complejo ya que no solo desempeñaría un papel antioxidante, sino también neutral o pro-oxidante. El mecanismo involucra el aumento los niveles de α -tocoferol, tras el aumento del estrés oxidativo, esto conllevaría al aumento de los niveles de radicales α -tocoferol. Cuando los antioxidantes están equilibrados, los co-antioxidantes pueden reducir el radical de regreso a vitamina E, pero si pasa lo contrario, estos radicales α -tocoferol pueden iniciar procesos de lipoperoxidación por sí mismos. Esta justificación bioquímica expone por qué los alimentos que poseen cantidades relativamente pequeñas de vitamina E, pero además co-antioxidantes, proporcionan mayores beneficios para la salud que los suplementos de vitamina E por sí solos. Otra vía para la lipoperoxidación podría deberse a que el radical tocoferoxilo puede ser reducido por el GSH, pero la aplicación conjunta con el $HgCl_2$ podría estar inhibiendo la acción del GSH debido a la afinidad que tiene con el grupo sulfhidrilos (SH), conllevando a la acumulación de radical tocoferoxilo causando peroxidación lipídica^{36, 72, 92}. Esto podría explicar el elevado nivel de lipoperoxidación que presentó el grupo III.

Debido al posible efecto pro-oxidante que puede causar la administración de Vitamina E a dosis altas, afectando a los fosfolípidos de membrana, traería por consecuencia la alteración de las funciones secretoras, la flexibilidad y permeabilidad de dicha membrana; por otro lado, los productos de degradación de la lipoperoxidación pueden influir también sobre la permeabilidad vascular, produciendo inflamación y edema^{74, 92}. Esto se puede ver reflejado en el alto nivel de índice de cerebelo y el examen histológico del grupo III.

La vitamina E modifica actividades enzimáticas, con los consiguientes efectos sobre la proliferación celular, la inflamación y la adhesión celular. Los experimentos

con animales mostraron que los bajos niveles de α -tocoferol en el cerebro inducen la regulación negativa de los genes implicados en la mielinización y la sinaptogénesis, el transporte de vesículas neuronales y en las funciones gliales, lo cual mejora el rendimiento cognitivo⁹³. Lo anterior expuesto podría estar relacionado con el bajo número de intentos (indicador de memoria) que le costó al ratón llegar al brazo meta del grupo III.

En el estudio de Assumaidae 2019 se realizó la administración de acetato de α -tocoferol (100 mg/kg) contra la toxicidad inducida por HgCl_2 (0,20 mg/kg) en ratas, cada dos días durante 42 días. Reportó que dicha administración produjo efectos protectores contra el desarrollo de la toxicidad, reflejado en los indicadores de lipoperoxidación, GSH y SOD. Esto se debió a que se pudo revertir el estrés oxidativo elevado, inducido por la administración de HgCl_2 , con la administración del α -tocoferol⁹⁴. Estos resultados difieren con lo encontrado en los niveles de lipoperoxidación del grupo III.

Owoeye en el 2018 evaluó la administración en conjunto y por separado de Vitamina E y HgCl_2 . En la evaluación de prueba de comportamiento se evidenció que el tratamiento conjunto de α -tocoferol con HgCl_2 no pudo revertir la toxicidad de HgCl_2 ; pero en el examen histológico del tejido cerebeloso la administración de α -tocoferol solo o con HgCl_2 demostró la habilidad de mantener la integridad celular de la neurona de Purkinje, los efectos tóxicos del HgCl_2 en el cerebelo fueron mitigados por el tratamiento con α -tocoferol y su acción neuroprotectora manteniendo la función de coordinación del movimiento⁹⁵. Este estudio difiere con lo encontrado en el presente estudio debido a que en el examen histológico se reportó edema a nivel de las células de Purkinje en el corte de cerebelo del grupo III.

El tratamiento con zumo de *Solanum quitoense* (lulo), a diferentes dosis, indujo a menores niveles de lipoperoxidación, relación SOD/CAT, índice de cerebro, índice de cerebelo, tiempo de latencia, número de intentos. Respecto a la relación GSH/GSSG se observa un mayor nivel. A nivel histológico en el cerebro se encontró presencia de células polimorfonucleares, linfocitos, leve edema y leve eosinofilia; en el cerebelo se encontró leve eosinofilia, neurópilo bien conservado, células de Purkinje con eosinofilia y componente vascular ligeramente congestivo.

Diversos estudios han reportado el contenido de compuestos benéficos para la salud como polifenoles, flavonoides, carotenoides (β -caroteno, luteína y zeaxantina), ácidos grasos, cumarinas, taninos, saponinas, esteroides, triterpenos, vitaminas C, B1, B2, B3, minerales como calcio, fósforo, hierro, zinc, magnesio y potasio, etc., en el fruto *Solanum quitoense* (lulo)^{39,41,42,43,44,47,96}. Acosta 2009 atribuyó la alta capacidad antioxidante del lulo, a los niveles altos de compuestos fenólicos (97 ± 17 mg de ácido gálico equivalentes por cada 100 g); coincidiendo con Contreras-Calderón 2010 y Vasco 2008⁴⁸.

Los bajos niveles de lipoperoxidación encontrados en los grupos que recibieron el zumo de lulo pueden guardar relación con la capacidad antioxidante de los carotenoides, en especial del β -caroteno, los cuales actúan secuestrando los radicales peróxidos y los incorporan a su sistema de dobles enlaces conjugados, formando un radical dentro del carotenoide, este se estabiliza por resonancia, interfiriendo con la fase de propagación de la lipoperoxidación^{72,97,98,99}.

Los taninos hidrolizables, como los galotaninos o elagitaninos, resultan de la esterificación de compuestos polifenólicos no flavonoides, como el ácido gálico o elágico, respectivamente. Debido a que en su conformación poseen esqueleto químico de seis carbonos (C_6) ligados a carbonos de dos carbonos (C_2) y a otro anillo C_6 , son capaces de neutralizar especies altamente reactivas, como el anión superóxido y radical hidroxilo ($OH\cdot$), así como también reducir la peroxidación de lípidos de membranas celulares^{100,101}. Esto podría tener relación con los niveles bajos de lipoperoxidación en los grupos experimentales a diferentes dosis.

Por otro lado, la actividad antioxidante también podría relacionarse con la presencia de ácido ascórbico en el zumo de lulo, su acción depende de su potencial de oxidorreducción, este actúa como secuestrador de ROS y RNS, al reaccionar con estas especies se forma el radical ascorbilo ($A\cdot$) que es de baja reactividad, el cual puede sufrir una dismutación para convertirse en ascorbato (ASC) o ácido dehidroascórbico (DHA), que son formas no radicales del ácido ascórbico. Otro mecanismo antioxidante que presenta se asocia a su capacidad de regenerar antioxidantes como el α -tocoferol, β -caroteno y GSH, que se pueden encontrar bajo su forma oxidada o bajo la forma de radical, como el caso del glutatión oxidado (GSSG) que al reducirse se forma el GSH^{72,97}. Este mecanismo podría explicar los niveles elevados de relación de GSH/GSSG que se observaron en los grupos a dosis de zumo.

La presencia de polifenoles como ácido gálico y ácido clorogénico juegan un rol importante en la actividad antioxidante, estos pueden unirse a los polímeros biológicos, ya sean enzimas, transportadores de hormonas y DNA, catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Otro beneficio que se le atribuye es su propiedad antiinflamatoria. Por otro lado, la acción de los flavonoides es retirar el oxígeno reactivo (aniones superóxidos, radicales OH, peróxidos lipídicos), de esta manera logra bloquear la acción tóxica de estas sustancias sobre las células, el efecto protector sobre la célula se puede ver reflejado a nivel endotelial⁷². Esto se podría observar en el estudio a nivel histológico y en los menores niveles de índice de cerebro e índice de cerebelo de los grupos experimentales.

El zumo presenta ácidos grasos poliinsaturados de la familia ω -3 (29,2%) y de la ω -6 (23,5%)⁵¹, también juega un rol importante en la neuroprotección, la incorporación de los AGPI ω -3 a la membrana de fosfolípidos, acrecienta la fluidez de la membrana celular y otras membranas como las mitocondriales, esto afecta la estructura y función de los receptores, transportadores, canales iónicos y enzimas. Los AGPI ω -3 pueden inhibir la transcripción de citoquinas proinflamatorias activando a los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), estos inhiben el NFkB, que participa en la transcripción de estas citoquinas proinflamatoria. Debido al mayor grado de insaturación de los AGPI ω -3, su incorporación a la membrana fosfolipídica puede producir desorganización parcial de los rafts lipídicos, lo que reduciría la producción y desplazamiento de proteínas de señalización, lo que puede reducir la activación celular. Durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria el ácido eicosapentaenoico es el sustrato para resolvinas de tipo E (RvE), estas moléculas se asocian con la activación disminuida y la migración de los leucocitos polimorfonucleares, lo que previene el proceso inflamatorio y la lesión del tejido¹⁰². Esto se puede ver reflejado a nivel histológico en los grupos tratados con diferentes dosis de lulo.

En el estudio de Sandoval-Ávila 2019, se evaluó el efecto neuroprotector de fitoquímicos como las saponinas, se encontró un fuerte efecto neuroprotector, probablemente atribuido a su efecto antioxidante debido a que mejora la conservación celular evitando la pérdida de estas y el acortamiento de neuritas. Su mecanismo de acción radica en disminuir las EROs, incrementa la proteína Bcl-2 y priva la liberación del citocromo C al citosol, lo cual evita que exista muerte celular¹⁰³. Por otro lado, Zhang 2012 comprobó el efecto protector de la saponina astragalósido-IV al provocar un aumento en la supervivencia celular, mediante la

disminución del tamaño del núcleo, la condensación de la cromatina y el fraccionamiento nuclear, así como también una disminución de las EROs y la inhibición de la caspasa 3¹⁰⁴. Lo anterior mencionado se puede apreciar en la respuesta de la evaluación cognitiva, con el menor tiempo de latencia y menor número de intentos que se evaluó con el laberinto en T.

Los componentes antioxidantes y otros fitoquímicos ya reportados en el fruto *Solanum quitoense* “lulo”, tales como los ácidos grasos poliinsaturados esenciales, polifenoles, flavonoides, saponinas y vitaminas, permitirían explicar los beneficios de este fruto frente a la toxicidad HgCl₂, demostrados por los resultados obtenidos a nivel morfológico, bioquímico y neurofisiológico en el presente trabajo. Por tanto, puede proponerse el potencial de este fruto como parte de otros estudios que complementen su uso y aplicación con fines nutracéuticos, con especial énfasis en grupos en riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

VI. CONCLUSIONES

- La ingesta del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) en las dosis de experimentación de 0,5 mL/kg, 2 mL/kg y 8 mL/kg produjo una disminución significativa de los niveles de lipoperoxidación y relación SOD/CAT, también mejoró el perfil de GSH.
- La ingesta del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) presentó mejor índice de cerebro en la dosis de experimentación media y alta, también logró disminuir el daño histológico en el tejido nervioso (cerebro y cerebelo), siendo el mejor resultado el del grupo VI.
- La ingesta del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) mostró una mejora a nivel cognitivo evidenciado en la prueba del laberinto en T (aprendizaje y memoria).
- La ingesta del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) presentó efecto neuroprotector en las tres dimensiones evaluadas frente a la toxicidad por cloruro de mercurio (II) en ratones.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar los componentes fitoquímicos del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) cultivados en el Perú.
- En base a los resultados mostrados, se sugiere realizar estudios posteriores que evalúen el consumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo) como tratamiento preventivo y/o complementario contra modelos de la enfermedad de Alzheimer.
- Ejecutar ensayos con los metabolitos secundarios de *Solanum quitoense* (lulo) en otros tejidos como hígado, riñón y estómago.
- Realizar ensayos con la cáscara del fruto *Solanum quitoense* (lulo).

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Custodio, N., García, A., Montesinos, R., Escobar, J., & Bendezú, L. Prevalencia de demencia en una población urbana de Lima-Perú: estudio puerta a puerta. In *Anales de la Facultad de Medicina*, UNMSM. Facultad de Medicina. 2008, December; (Vol. 69, No. 4, pp. 233-238). Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v69n4/a03v69n4.pdf>.
2. Martínez, D. B., Soldevilla, M. G., Santiago, A. P., & Martínez, J. T. Enfermedad de Alzheimer. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. (2019); 12(74), 4338-4346. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541219300538>.
3. www.who.int/es [Internet]. Suiza: Organización Mundial de la Salud; 1948 [actualizado 12 diciembre 2017; consultado 23 agosto 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
4. Niua H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Sociedad Española de Neurología*. 2016 [cited 19 November 2017];32(8):523-532. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213485316300032#bib0370>.
5. Armenteros Borrell, F. M. Enfermedad de Alzheimer y factores de riesgo ambientales. *Revista Cubana de Enfermería*. (2017); 33(1), 159-172. Disponible en: <http://www.revenfermeria.sld.cu/index.php/enf/article/view/1024/239>.
6. Abubakar, I. I., Tillmann, T., & Banerjee, A. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. (2015); 385(9963), 117-171. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(14\)61682-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(14)61682-2/fulltext).
7. Patterson, C. World Alzheimer Report 2018: the state of the art of dementia research: new frontiers. Alzheimer's Disease International (ADI): London, UK. (2018). Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>.
8. Alzheimer's association. Alzheimer's Disease Facts and Figures. 2020. Disponible en: <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/hechos-y-cifras>.

9. Soares, N. M., Pereira, G. M., Figueiredo, R. I. D. N., Soares, N. M., Almeida, R. M. M. D., & Portela, A. D. S. Impacto econômico e prevalência da doença de Alzheimer em uma capital Brasileira. *Ciência & Saúde*. Porto Alegre: PUCRS, 2008. (jul./set 2017). Vol. 10, n. 3, p. 133-138. Disponible en: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/166234>.
10. Ministerio de Salud (MINSA). Alzheimer afecta a más de 200 mil adultos mayores em Perú. Set, 2019. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/51175-alzheimer-afecta-a-mas-de-200-mil-adultos-mayores-en-peru>.
11. Contreras, C., Condor, I., Atencio, J., & Atencio, M. Prevalencia de demencia y funcionalidad en una clínica geriátrica de Huancayo, Perú, 2016-2017. In *Anales de la Facultad de Medicina*; UNMSM. Facultad de Medicina. 2019, January; (Vol. 80, No. 1, pp. 51-55). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832019000100009.
12. Bravo Alvarado, A. I., & Monroe Velásquez, S. V. Necesidad de reglamentación de la Ley N° 30020, que crea el Plan Nacional para la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, caso APEAD (Asociación Peruana de Enfermedad de Alzheimer y otras demencias), Surco, 2013-2015. (2016). Disponible en: <http://146.20.92.109/handle/UTP/1220>.
13. Costanzo, L. S. Fisiología. Elsevier. (2018). Disponible en: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=H9zQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=linda+S.+costanzo+fisiolog%C3%ADa+5ta+edicion&ots=ll_sy7jig8&sig=JDZ6erbpu_8AkO96vSvn-Xg7FU#v=onepage&q&f=false.
14. Gardner E, Gray D, O'rahilly R. Anatomía estudio por regiones del cuerpo humano. 5ta ed. Barcelona: SALVAT EDITORES, S.A; 1971.
15. Guyton, A. C., & Hall, J. E. *Compendio de fisiología médica*. Elsevier. (2012).
16. Gartner L, Hiatt J. Texto Atlas de Histología. 3ra ed. México, D.F.: McGraw-Hill INTERAMERICANA EDITORES, S.A.; 2010.
17. Sharma, S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci* 2010; 87; 521–536.
18. Murphy G. Spatial Learning and Memory—What's TLE Got To Do With It? *Epilepsy Curr* 2013; 13(1): 26–29.

19. Van Strien N, Cappaert N, Witter M. The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10(4), 272-282. doi: 10.1038/nrn2614.
20. Rolls E. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Front Syst Neurosci* 2013; 7: 7-21.
21. Squire L, Wixted J. The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 259–288. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113720.
22. Allen T, Fortin, N. The evolution of episodic memory. *PNAS* 2013; 110 (Supl 2): 10379–10386. doi:10.1073/pnas.1301199110.
23. Benavides-Caro, C. A. Deterioro cognitivo en el adulto mayor. *Revista Mexicana de Anestesiología*. (2017). 40(2), 107-112.
24. McPhee s, Lingappa V, Ganong W. Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica. 4th ed. distrito federal de México: El Manual Moderno S.A.; 2003.
25. Arnoldo, P. S., Marilet, Á. S., & Lázaro, Á. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Mexicana de Neurociencia*. (2008). 9(3), 196-201.
26. Delacourte, A. Fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer. *EMC-Tratado de Medicina*. (2002). 6(4), 1-11.
27. Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., & Waksmundzka-Hajnos, M. The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. (2016). 78, 39-49. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332215303103?via%3Dihub>.
28. González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., & Ortiz-Muñiz, R. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. (2000). 25(1), 3-9. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/576/57611797001.pdf>.
29. Paumi CM, Ledford BG, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS. Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione-S-transferase A1-1 in alkylating agent resistance. Kinetics of glutathione conjugate formation and efflux govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus memphalan toxicity. *J Biol Chem* 2001;276:7952-6.

30. Corrales, L. C., & Ariza, M. M. M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. (2012). 10(18). Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/205>.
31. Teixeira, F. B., Fernandes, R. M., Farias-Junior, P., Costa, N. M., Fernandes, L. M., Santana, L. N., ... & Lima, R. R. Evaluation of the effects of chronic intoxication with inorganic mercury on memory and motor control in rats. *International journal of environmental research and public health*. (2014). 11(9), 9171-9185. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25198682>.
32. La toxicología del mercurio y sus compuestos químicos. *Clarkson TW, Magos L Crit Rev Toxicol. Septiembre de 2006; 36 (8): 609-62*.
33. Szumańska, G., Gadamski, R., & Albrecht, J. Changes of the Na/K ATPase activity in the cerebral cortical microvessels of rat after single intraperitoneal administration of mercuric chloride: histochemical demonstration with light and electron microscopy. *Acta neuropathologica*. (1993). 86(1), 65-70. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00454900>.
34. Eblen-Zajjur, A. *Edema isquémico cerebral: de lo experimental a lo clínico*. (2013). Disponible en: <http://bdigital2.ula.ve:8080/xmlui/bitstream/handle/654321/1925/art07.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
35. Karliner, J., & Harvie, J. Movimiento mundial para el cuidado de la salud libre de mercurio. *Salud sin daño*. (2007). 24. Disponible en: https://saludsindanio.org/sites/default/files/documentsfiles/1456/Movimiento_Libre_de_Mercurio.pdf.
36. Ramírez, A. V. Intoxicación ocupacional por mercurio. In *Anales de la Facultad de Medicina*; UNMSM. Facultad de Medicina. (2008, March); (Vol. 69, No. 1, pp. 46-51). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102555832008000100010.
37. Lara, H. H., Alanís-Garza, E. J., Puente, M. F. E., Mureyko, L. L., Torres, D. A. A., & Turrent, L. I. Nutrición que previene el estrés oxidativo causante del Alzheimer. Prevención del Alzheimer. *Gac Med Mex*. (2015); 151, 245-51. Disponible en: http://www.anmm.org.mx/GMM/2015/n2/GMM_151_2015_2_245-251.pdf.

38. Ashwell, M. *Conceptos sobre los alimentos funcionales*. ILSI Europe. (2004). Disponible en: https://www.academia.edu/7437035/ILSI_conceptos_sobre_los_alimentos_funcionales.
39. Acosta, Ó., Pérez, A. M., & Vaillant, F. Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivated in Costa Rica. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. (2009); 59(1), 88. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Fabrice_Vaillant/publication/26251338_Chemical_characterization_antioxidant_properties_and_volatile_constituents_of_naranjilla_a_Solanum_quitoense_Lam_cultivated_in_Costa_Rica/links/00463515f3a0e7a88f000000.pdf.
40. SICA. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Ministerio de Agricultura y Ganadería, Servicio de Información Agropecuaria Indicadores económicos del Ecuador. (2006).
41. Moreno Guerrero C, Andrade Cuví M, Concellón A, Díaz Navarrete G. Estudio de la capacidad antioxidante durante el almacenamiento refrigerado de Naranjilla (*Solanum quitoense*) tratada con radiación UV-C. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 2013; 14(2):125-132. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/813/81329290005.pdf>.
42. Andrade, M. J., Moreno, C., & Concellón, A. Efecto de la radiación UV-C sobre la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en frutos exóticos del Ecuador: Naranjilla (*Solanum quitoense*) Y Mortiño (*Vaccinium floribundum*). *Tsafiqui*. (2012); (3), 31-42. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/320966803_efecto_de_la_radiacion_uv-c_sobre_la_capacidad_antioxidante_y_contenido_de_fenoles_totales_en_frutos_exoticos_del_ecuador_naranjilla_solanum_quitoense_y_mortino_Vaccinium_floribundum.
43. Cerón, I., Higueta, J., & Cardona, C. Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector*. (2010); 5(2011), 5. Disponible en: http://vip.ucaldas.edu.co/vector/downloads/Vector5_2.pdf.
44. Morton, J. Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam., *Solanum angulatum* Lam.). *Fruits of warm climates*, Miami, FL. (1987); 425-428. Disponible en: <http://www.sidalc.net/cgi->

bin/wxis.exe/?IsisScript=frutal.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000430.

45. Forero, D. P., Orrego, C. E., Peterson, D. G., & Osorio, C. Chemical and sensory comparison of fresh and dried lulo (*Solanum quitoense* Lam.) fruit aroma. *Food chemistry*. (2015); 169, 85-91. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614011595>.

46. Medina, C. I., Sánchez, D., Camayo, G., Lobo, M., & Martínez, E. Anatomía foliar comparativa de materiales de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) con y sin espinas. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. (2008); 9(1), 5-13. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945024001.pdf>.

47. Andrade-Cuvi, M. J., Moreno-Guerrero, C., Guijarro-Fuertes, M., & Concellón, A. Caracterización de la naranjilla (*Solanum quitoense*) común en tres estados de madurez. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*. (2015); 16(2), 215-221. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/813/81343176010.pdf>.

48. Flechas, H., Sánchez, L., & Silva, J. Tamizaje Fitoquímico y Cálculo de Rendimiento de Sapogeninas Esteroidales de Tres Procedencias de *Solanum Quitoense* Var. "Septentrionale" Naranjillo". *Colombia forestal*. (2008); 11(1), 201-214. Disponible en: <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/colfor/article/view/3028>.

49. Ramírez Roca, E. G. Efecto del extracto acuoso de la papa nativa *Solanum tuberosum* "puca simi" sobre enzimas de detoxificación de fase II en un modelo de hiperbilirrubinemia. (2015). Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/download/11117/9992/>.

50. Del Giudice, R., Petruk, G., Raiola, A., Barone, A., Monti, D. M., & Rigano, M. M. Carotenoids in fresh and processed tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits protect cells from oxidative stress injury. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. (2017); 97(5), 1616-1623. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jsfa.7910>.

51. Loizzo, M. R., Lucci, P., Núñez, O., Tundis, R., Balzano, M., Frega, N. G., ... & Pacetti, D. (2019). Native colombian fruits and their by-products: Phenolic profile, antioxidant activity and hypoglycaemic potential. *Foods*, 8(3), 89. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6462985/>.

52. Hernández R. Metodología de la Investigación. sexta. McGraw-Hill /Interamericana Editores SADC., editor. México D.; 2014.
53. Codex, STAN 247-2005. Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. 2005, 15:1.
54. Hernández Morfa, M. Identificación in silico de nuevos inhibidores de la MAO con posible acción neuroprotectora (Doctoral dissertation, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Facultad de Química Farmacia. Departamento de Farmacia). (2016). Disponible en: <http://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/7721>.
55. Morgado I. Psicobiología del aprendizaje y la memoria. CIC. 2005. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/935/93501010/>.
56. Fuentes Paredes, F. D. M., Mendoza Yanavilca, R. A., Rosales Fernández, A. L., & Cisneros Tarmeño, R. A. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. (2010). Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATON.pdf.
57. Glaser, V. Effects of inorganic selenium administration in methylmercury- induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. International Journal of Developmental Neurociencia. 2010; 28: 631-637. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/20620206>.
58. Buege J, Aust E. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978;52:302-10.
59. Suárez S. Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobioticos alimentarios. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1995.
60. Seldlak J, Lindsay H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem. 1968;205:192–205.
61. Marklund S. and Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and Convenient Assay for Superoxide Dismutase, Eur J Biochem. 1974; 47: 469-474.
62. Aebi H. Catalase in Vitro. Methods in Enzymology. 1947; 105: 121-126.
63. Sandoval, M., Lazarte, K., & Arnao, I. Hepatoprotección antioxidante de la cáscara y semilla de *Vitis vinifera* L.(uva). In *Anales de la Facultad de Medicina*. UNMSM. Facultad de Medicina. (2008, December); (Vol. 69, No. 4, pp. 250-259).

Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832008000400006.

64. Deacon R and Rawlins P. T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*. 2006; 1(1): 7-12.

65. Vega, S., & Watanabe, R. Análisis de la Ley 30407 «Ley de Protección y Bienestar Animal» en el Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. (2016); 27(2), 388-396.

66. Guía de manejo y Cuidado de animales de Laboratorio: ratón. Ministerio de Salud. Centro Nacional de Productos Biológicos. INS. Lima 2008.

67. Lutz, M., Arancibia, M., & Stojanova, J. La revisión sistemática como herramienta para la validación científica de propiedades saludables de los alimentos y factores alimentarios. *Medwave*. (2019); 19(06). Disponible en: <https://www.medwave.cl/link.cgi/medwave/revisiones/analisis/7664.act?ver=sindise.no>.

68. Cámpora, M. C. Alimentos funcionales: tecnología que hace la diferencia. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*. (2016); 42(2), 131-137. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/864/86447075004.pdf>.

69. Naranjo-Gómez, J. S., Zambrano-Cardona, F., Uribe-García, F., Ramírez, K., Vargas-Morales, J. A., & Rondón-Barragán, I. S. Immunotoxicological and histopathological effects of exposure to sublethal concentrations of mercuric chloride (HgCl₂) in red-bellied pacu (*Piaractus brachipomus*). *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. (2014); 9(1), 26-42. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5450746>.

70. Venereo Gutiérrez, J. R. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*. (2002); 31(2), 126-133. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572002000200009&script=sci_arttext&tlng=pt.

71. Zorrilla García, A. E. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*. (2002); 21(3), 178-185. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002002000300006&script=sci_arttext&tlng=en.

72. Konigsberg Fainstein M. Radicales libres y estrés oxidativo, Aplicaciones médicas. Martínez Moreno M, editor. 2008.

73. Riverón Forment, G., Faife, J. A., Fernández Díaz, I. D. L. M., del Castillo Martín, N. P., Gutiérrez Gutiérrez, R., Pandolfi Blanco, A., ... & Jaime Novas, A. Marcadores de estrés oxidativo y genotoxicidad en trabajadores cubanos con exposición ocupacional prolongada al Mercurio. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*. (2014); 15(1), 35-41. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=53836>.
74. López, C. A. V. Edema cerebral. Fisiopatología y principios de tratamiento. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca*. (2002); 4(1), 32-40. Disponible en: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/rfcs/article/view/1012>.
75. de Lores Arnaiz, G. R., & Ordieres, M. G. L. Brain Na⁺, K⁺-ATPase activity in aging and disease. *International journal of biomedical science: IJBS*. (2014); 10(2), 85. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4092085/>.
76. Ballatori, N., & Boyer, J. L. Disruption of cell volume regulation by mercuric chloride is mediated by an increase in sodium permeability and inhibition of an osmolyte channel in skate hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*. (1996); 140(2), 404-410. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X96902379>.
77. Wiggers, G. A., Peçanha, F. M., Briones, A. M., Perez-Giron, J. V., Miguel, M., Vassallo, D. V., ... & Salaices, M. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. (2008); 295(3), H1033-H1043. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599595>.
78. Park, H. J., & Youn, H. S. Mercury induces the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Toxicology and industrial health*. (2013); 29(2), 169-174. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080037>.
79. Bondy S.C., Agrawal A.K. The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Arch. Toxicol*. 1980;46:249–256. doi: 10.1007/BF00310441.
80. Castoldi A.F., Candura S.M., Costa P., Manzo L., Costa L.G. Interaction of mercury compounds with muscarinic receptor subtypes in the rat brain. *Neurotoxicology*. 1996;17:735–742.

81. Arakawa O., Nakahiro M., Narahashi T. Mercury modulation of GABA-activated chloride channels and non-specific cation channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 1991;551:58–63.
82. Rajanna B., Rajanna S., Hall E., Yallapragada P.R. In vitro metal inhibition of N-methyl-d-aspartate specific glutamate receptor binding in neonatal and adult rat brain. *Drug Chem. Toxicol.* 1997;20:21–29. doi: 10.3109/01480549709011076.
83. Scheuhammer A.M., Cherian M.G. Effects of heavy metal cations sulfhydryl reagents and other chemical agents on striatal D2 dopamine receptors. *Biochem. Pharmacol.* 1985;34:3405–3413. doi: 10.1016/0006-2952(85)90710-5.
84. Cisneros, R., Oré, R., Arnao, I., & Suárez, S. Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii* walp). In *Anales de la Facultad de Medicina*. (2011, April); (Vol. 72, No. 2, pp. 107-111). UNMSM. Facultad de Medicina. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832011000200003.
85. Martínez-Sámano, J., Torres-Durán, P. V., & Juárez-Oropeza, M. A. El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de Educación Bioquímica*. (2011); 30(2), 56-67. Disponible en: <https://www.mediagraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2011/reb112c.pdf>.
86. Sobrino Plata, J. Evaluación del metabolismo del glutatión en la tolerancia a metales pesados. (2014). Disponible en: <https://repositorio.uam.es/handle/10486/660317>.
87. Ferrer, A. Intoxicación por metales. In *Anales del sistema sanitario de Navarra*. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud. (2003); (Vol. 26, pp. 141-153). Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v26s1/ocho.pdf>.
88. Moneim, A. E. A. The neuroprotective effect of berberine in mercury-induced neurotoxicity in rats. *Metabolic brain disease*. (2015); 30(4), 935-942. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11011-015-9652-6>.
89. Fernández, C. F., Febles, C. S., Bernabeu, A. S., & Triana, B. E. G. Funciones de la vitamina E: Actualización. *Rev Cubana Estomatol.* (2019); 39(1), 28-32. Disponible en: <http://www.revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/2340>.

90. Ferri, P., Angelino, D., Gennari, L., Benedetti, S., Ambrogini, P., Del Grande, P., & Ninfali, P. Enhancement of flavonoid ability to cross the blood–brain barrier of rats by co-administration with α -tocopherol. *Food & function*. (2015); 6(2), 394-400. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/fo/c4fo00817k/unauth#!divAbstract>.
91. Montier Iglesias, A., Cabezas Alfonso, I., Díaz Cabrera, J. C., Linares Guerra, E. M., & Jerez Hernández, E. Efecto de la vitamina E sobre antioxidantes endógenos en ratas Wistar diabéticas. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*. (2018); 22(3), 25-39. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942018000300004.
92. Rietjens, I. M., Boersma, M. G., de Haan, L., Spenkelink, B., Awad, H. M., Cnubben, N. H., ... & Koeman, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental toxicology and pharmacology*. (2002); 11(3-4), 321-333. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668902000030>.
93. Grundman, M. Vitamin E and Alzheimer disease: the basis for additional clinical trials. *The American journal of clinical nutrition*. (2000); 71(2), 630S-636S. Disponible en: <https://academic.oup.com/ajcn/article/71/2/630S/4729332>.
94. Assumaidae, A. A. M., Ali, N. M., & Fadhil, A. A. Effect of Vitamin E as α -Tocopherol Acetate on Mercuric Chloride-Induced Chronic Oxidoreductive Stress and Nephrotoxicity in Rats. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. (2019); 43(2), 98-108. Disponible en: <https://www.iasj.net/iasj?func=article&ald=177346>.
95. Owøye, O. L. A. T. U. N. D. E., Mattu, J. S., & Thomas, M. A. Bromocriptine and vitamin E were protective against mercury-induced Purkinje neuron injury in male Wistar rats. *African Journal of Biomedical Research*. (2018); 21(2), 193-199. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?md18030>.
96. Instituto Nacional de Nutrición (Colombia). *Tabla de composición de alimentos Colombianos*. (1967). Disponible en: https://www.icbf.gov.co/sites/default/files/tcac_web.pdf.
97. Maestro-Durán, R. y Borja Padilla, R. Actividad antioxidante de las vitaminas C y E y de la provitamina A. *Grasas y aceites*. (1993). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/49583471_Actividad_antioxidante_de_las_vitaminas_C_y_E_y_de_la_provitamina_A.

98. Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M., & Pérez-Gil Romo, F. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Arch. latinoam. Nutr.* (2011); 233-241. Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>.
99. Burton, G. W. Antioxidant action of carotenoids. *The Journal of Nutrition.* (1989); 119(1), 109-111. Disponible en: <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/119/1/109/4738999>.
100. Vázquez-Flores, A. A., Álvarez-Parrilla, E. M. I. L. I. O., López-Díaz, J. A., Wall-Medrano, A., & De la Rosa, L. A. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua.* (2012); 6(2), 84-93. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Abraham_Wall/publication/277816258_Taninos_hidrolizables_y_condensados_naturaleza_quimicaventajas_y_desventajas_de_su_consumo/links/5574b34c08aeacff1ffcbfc7.pdf.
101. Abraham, W. M., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, A. Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. Producto de investigación. (2015). Disponible en: <http://148.210.21.138/handle/20.500.11961/2742>.
102. Waitzberg, D. L., & Garla, P. Contribución de los ácidos grasos Omega-3 para la memoria y la función cognitiva. *Nutrición Hospitalaria.* (2014); 30(3), 467-477. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v30n3/01revision01.pdf>.
103. Sandoval-Avila, S., Diaz, N. F., Gómez-Pinedo, U., Canales-Aguirre, A. A., Gutiérrez-Mercado, Y. K., Padilla-Camberos, E., ... & Díaz-Martínez, N. E. Efecto neuroprotector de fitoquímicos en cultivo de neuronas dopaminérgicas. *Neurología,* (2019). 34(2), 114-124. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213485316300779?via%3Dihub>.
104. Z.G. Zhang, L. Wu, J.L. Wang, J.D. Yang, J. Zhang, J. Zhang, et al. Astragaloside IV prevents MPP(+)-induced SH-SY5Y cell death via the inhibition of Bax-mediated pathways and ROS production. *Mol Cell Biochem.*, 364 (1-2) (2012), pp. 209-216. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-011-1219-1>.

ANEXOS

ANEXO I

Fruto de *Solanum quitoense* (lulo)



ANEXO II

Clasificación taxonómica del fruto (*Solanum quitoense*)



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 27-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (fruto), recibida de **Olenka Isabel PUELLES SAMANIEGO**; de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; ha sido estudiada y clasificada como: ***Solanum quitoense* Lam.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: SOLANALES

FAMILIA: SOLANACEAE

GENERO: *Solanum*

ESPECIE: *Solanum quitoense* Lam.

Nombre vulgar: "Lulo o naranjillo".

Determinado por: Mg. Asunción Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 23 de enero de 2018


Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/yhr.

ANEXO III

Certificado Sanitario de la unidad de análisis

		INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO	
CERTIFICADO SANITARIO N°		270-2017	
Producto	: Ratón albino	Cepa	: Balb/c/CNPB
Especie	: <u><i>Mus musculus</i></u>		
Lote N°	: M-52-2017		
Peso	: Mayor a 25 gr. (1 mês ½)	Cantidad	: 36 (machos)
Guía de Remisión	: 035164		
Fecha	: 27.12.2017	Destino	: Universidad Nacional Mayor de San Marcos U.N.M.S.M.
<p>El Médico Veterinario que suscribe, Arturo Rosales Fernández. Coordinador de Bioterio, CERTIFICA, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>* Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el Ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para animales de experimentación.</p>			
Chorrillos, 27 de Diciembre del 2017			
(fecha de entrega)		 M.V. Arturo Rosales Fernández. C.M.V.P. 1586 Coordinador de Bioterio	
<p>NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>			

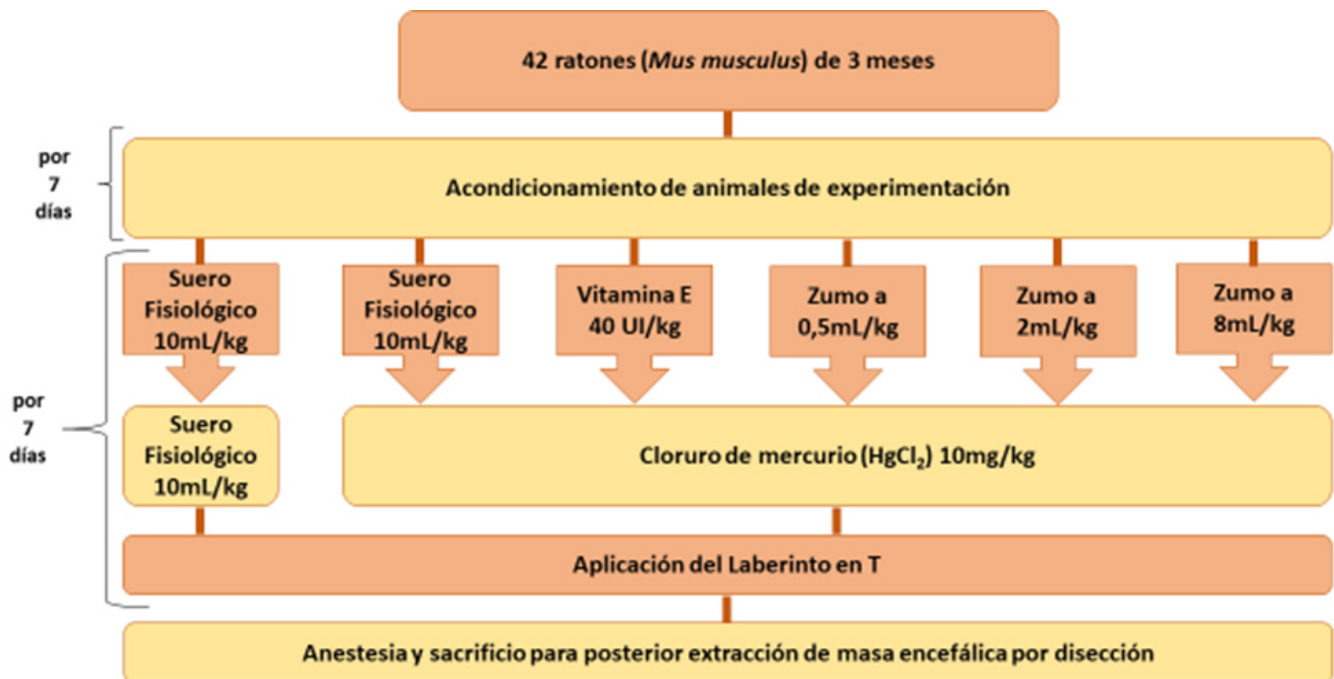
ANEXO IV

Administración del zumo del fruto *Solanum quitoense* (lulo)



ANEXO V

Flujograma de la ejecución experimental



ANEXO VI

Disección de hemisferios cerebrales y cerebelo



ANEXO VII

Realización de prueba cognitiva aplicando el Laberinto en T

